

**Regulierte Heterodimerisierung der NO-sensitiven
Guanylyl-Cyclase im Rattenhirn und die direkte
Fusion der Untereinheiten für *in vitro*
Untersuchungen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Nadine Haase
aus Frankfurt (Oder)

| | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Referent: | Professor Dr. Soenke Behrends |
| 2. Referent: | Professor Dr. Uwe Panten |
| eingereicht am: | 26.07.2010 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 21.10.2010 |

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

N. Haase, T. Haase, M. Seeanner, and S. Behrends. 2010. Nitric oxide sensitive Guanylyl-Cyclase activity decreases during cerebral postnatal development because of a reduction in heterodimerization. *J Neurochem.* 112:542-551.

N. Haase, T. Haase, J.R. Kraehling, and S. Behrends. 2010. Direct fusion of subunits of heterodimeric nitric oxide sensitive Guanylyl-Cyclase leads to functional enzymes with preserved biochemical properties: evidence for isoform specific activation by ciguates. *Biochem Pharmacol.* eingereicht

Tagungsbeiträge

N. Haase, M. Seeanner, T. Haase, and S. Behrends. 2009. Lack of correlation between sGC subunit expression and sGC activity in cerebral development is due to non-heterodimerizing subunits in vivo. *BMC Pharmacology.* 9:P20. 4th International Conference on cGMP, Regensburg Juni 2009

T. Haase, **N. Haase**, M. Busker, J.R. Kraehling, M. Linnenbaum, S. Oberle, and S. Behrends. 2010. Generation of monomeric "conjoined" NO-sensitive Guanylyl-Cyclase enzyme complexes. *Jahrestagung der DPhG 2010.* eingereicht

*In liebevollem Gedenken an meinen Opa,
Kurt Hehne*

** 29.07.1930 † 05.10.2009*

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG..... | 11 |
| 1.1 NO-sensitive Guanylyl-Cyclasen | 13 |
| 1.2 Endogene Aktivatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase..... | 17 |
| 1.3 Modulatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase | 18 |
| 1.4 Effektorsysteme von cGMP | 21 |
| 2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG..... | 24 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 26 |
| 3.1 Material..... | 26 |
| 3.1.1 Chemikalien und Substanzen..... | 26 |
| 3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien | 28 |
| 3.1.3 Stammlösungen | 31 |
| 3.1.4 Vektoren..... | 31 |
| 3.1.5 Oligonukleotide | 31 |
| 3.1.6 Enzyme und Reagenziensysteme..... | 32 |
| 3.1.7 Antikörper..... | 32 |
| 3.1.8 Zellen | 33 |
| 3.1.8.1 Bakterienstämme | 33 |
| 3.1.8.2 Eukaryotische Zelllinien | 33 |
| 3.1.9 Tierhaltung und Organentnahme | 33 |
| 3.1.10 Hilfsmittel und Geräte..... | 34 |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden | 35 |
| 3.2.1 Klonierung von DNA in Plasmidvektoren..... | 35 |
| 3.2.1.1 Klonierung fluoreszenzmarkierter NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase Untereinheiten | 37 |
| 3.2.1.2 Klonierung des $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstruktes..... | 37 |
| 3.2.1.3 Klonierung des $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstruktes..... | 38 |
| 3.2.1.4 Klonierung eines STREptag II an die α_1 - und α_2 -Untereinheit | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1.5 Klonierung eines STREptag II an die β_1 -Untereinheit | 40 |
| 3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 40 |
| 3.2.3 Transformation von DNA in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen..... | 41 |
| 3.2.4 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> Kulturen | 41 |
| 3.2.5 Analyse der präparierten Plasmid-DNA | 42 |
| 3.3 Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur | 42 |
| 3.3.1 Proteinisolierung aus Gewebe | 42 |
| 3.3.2 Bestimmung der Hämkonzentration von Hämoproteinen im Rattenhirn... | 43 |
| 3.3.3 Herstellung rekombinanter Proteine im Baculovirus-Expressionssystem. | 44 |
| 3.3.3.1 Klonierung in den Transfervektor pFASTBAC-1..... | 44 |
| 3.3.3.2 Transposition in DH10BAC <i>E.coli</i> -Zellen..... | 45 |
| 3.3.3.3 Kultivierung von Sf9-Zellen | 45 |
| 3.3.3.4 Transfektion der Sf9-Zellen | 46 |
| 3.3.3.5 Amplifikation der isolierten Baculoviren..... | 47 |
| 3.3.3.6 Titerbestimmung der Baculoviren nach der Endpunktverdünnungs- methode..... | 47 |
| 3.3.4 Infektion der Sf9-Zellen zur Herstellung der rekombinanten Proteine | 48 |
| 3.3.5 Gewinnung des rekombinanten Proteins aus den infizierten Sf9-Zellen .. | 48 |
| 3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration | 49 |
| 3.3.7 Bestimmung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität | 49 |
| 3.3.8 Immunpräzipitation | 50 |
| 3.3.9 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) | 51 |
| 3.3.10 Sensitive Coomassie Färbung | 51 |
| 3.3.11 Western Blot Analyse | 51 |
| 3.4 Anreinigung rekombinanter Proteine aus Sf9-Zellen mittels Chromatographie..... | 52 |
| 3.4.1 Herstellung der cytosolischen Fraktion | 52 |
| 3.4.2 Affinitätschromatographie mittels Strep-Tactin..... | 53 |
| 3.4.3 Umpuffern mittels Gelfiltrationschromatographie | 54 |
| 3.4.4 Anionenaustauschchromatographie..... | 54 |
| 3.4.5 Centricon-Verfahren | 55 |
| 3.4.6 Untersuchung des angereinigten Proteins | 55 |
| 3.4.7 Analytische Gelfiltrationschromatographie | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5 Statistische Auswertung | 56 |
| 4. ERGEBNISSE | 57 |
| 4.1 Untersuchungen an endogener NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase im zentralen Nervensystem | 57 |
| 4.1.1 Subzelluläre Lokalisation im Kleinhirn und Großhirn | 57 |
| 4.1.2 Bestimmung der Hämkonzentration im Rattenhirn | 60 |
| 4.1.3 Einfluss von hämunabhängigen Guanylyl-Cyclase-Aktivatoren auf die Enzymaktivität | 61 |
| 4.1.4 Untersuchungen zur Heterodimerisierung | 62 |
| 4.1.4.1 Heterodimerisierung im Großhirn | 62 |
| 4.1.4.2 Heterodimerisierung im Kleinhirn | 65 |
| 4.1.5 Zusammenfassung der Daten zu den Untersuchungen an endogener NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase im zentralen Nervensystem | 66 |
| 4.2 Untersuchungen an der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im rekombinanten System | 67 |
| 4.2.1 Die Homodimerisierung der Untereinheiten | 67 |
| 4.2.2 Expression der NOsGC Fusionskonstrukte | 69 |
| 4.2.3 Untersuchungen an anreinigten NOsGC Fusionskonstrukten | 72 |
| 4.2.3.1 Spektroskopische Untersuchung | 74 |
| 4.2.3.2 Analytische Gelfiltration der NOsGC Fusionskonstrukte | 74 |
| 4.2.3.3 Bestimmung der Enzymaktivität | 75 |
| 4.2.3.4 Enzymkinetik der NOsGC Fusionskonstrukte | 77 |
| 4.2.3.5 Konzentrationsabhängiger Einfluss von DEA/NO | 79 |
| 4.2.3.6 Einfluss von YC-1 auf die NOsGC Fusionskonstrukte | 80 |
| 4.2.3.7 Einfluss von BAY 41-2272 auf die NOsGC Fusionskonstrukte | 80 |
| 4.2.3.8 Einfluss von Cinaciguat und Ataciguat | 81 |
| 4.2.3.9 Einfluss von Tween 20 und Protoporphyrin IX | 83 |
| 4.2.4 Zusammenfassung der Daten zu den Untersuchungen an der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im rekombinanten System | 85 |
| 4.2.4.1 Charakterisierung der NOsGC Fusionskonstrukte | 85 |
| 4.2.4.2 Vergleich der Daten in Bezug auf die Enzymisoformen | 85 |

| | |
|---------------------------------------|------------|
| 5. DISKUSSION | 87 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 103 |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS | 104 |
| 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 118 |
| 9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 120 |

1. Einleitung

Für Organismen sind Signaltransduktionswege essentiell, um auf intrazelluläre und extrazelluläre Stimuli zu reagieren. Viele von diesen Signalwegen sind Angriffspunkte von Pharmaka, die eingesetzt werden lange bevor ihr Mechanismus aufgeklärt ist. Ein typisches Beispiel ist Glyceroltrinitrat, das älteste NO-freisetzende Pharmakon, das seit 1879 zur Behandlung der akuten Angina pectoris etabliert ist [1]. Erst 100 Jahre später konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Glyceroltrinitrat und die Aktivierung der Guanylyl-Cyclase der Grund für die therapeutische Wirkung bei der Behandlung der koronaren Herzkrankheit war.

Nach der Entdeckung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) als intrazellulärem Botenstoff 1958 durch Rall und Sutherland [2-3], wurde cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) 1963 erstmals im Urin und später in vielen Geweben nachgewiesen [4-6]. In den darauf folgenden Jahren wurden die cGMP-bildenden Enzyme, die Guanylyl-Cyclasen, in mehreren Zellpräparationen identifiziert [7]. Ihre Einteilung erfolgte aufgrund der Lokalisation in der Zelle in zwei Klassen: in eine membranständige und eine lösliche Form, die sich in ihren kinetischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden [8-15]. Während die hormonelle Regulation der Adenylyl-Cyclase durch Adrenalin Vorraussetzung für die Entdeckung des ersten cyclischen Nukleotids cAMP war, blieben die Aktivatoren der Guanylyl-Cyclasen lange unbekannt [2-3].

Die Suche nach den Aktivatoren begann mit Kaminsky et al., die zeigten, dass durch eine Calcium-Infusion die Ausscheidung von cGMP im Urin erhöht wird [16]. Außerdem wurde bei der Perfusion von Rattenherzen durch die Zugabe von Acetylcholin oder Bradykinin beobachtet, dass sich der cGMP Spiegel erhöht [17]. Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass Calciumionen eine wichtige Rolle bei der Regulation des cGMP Spiegels im Gewebe spielt [18]. Ein weiterer Teil des Rätsels um die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase wurde im Jahre 1977 bekannt. Mehrere Forschergruppen fanden heraus, dass die lösliche Guanylyl-Cyclase durch NO bzw. organische Nitrate wie Glyceroltrinitrat aktiviert wird [19-22]. Die Enzymaktivierung durch NO wurde als ein nicht-physiologisches Phänomen

aufgefasst, da es nicht denkbar erschien, dass das Atem- und Umweltgift NO endogen gebildet wird.

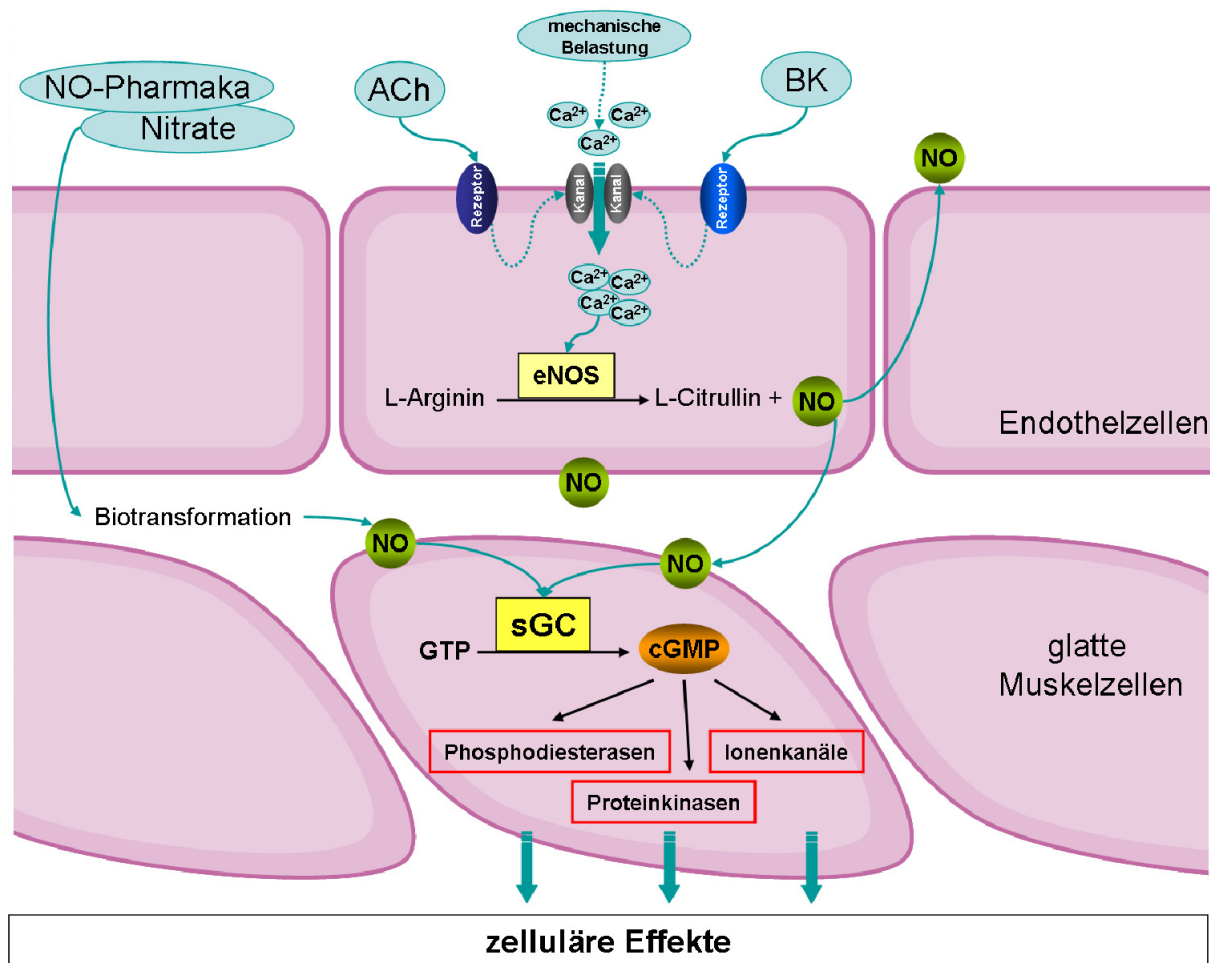


Abbildung 1: NO / cGMP Signalweg

Schema des NO / cGMP Signalweges in arteriellen glatten Muskelzellen. Stickstoffmonoxid (NO) wird in den Endothelzellen aus der Aminosäure L-Arginin durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) synthetisiert. Die Stimulation des Endothels zum Beispiel durch Acetylcholin (ACh), Bradykinin (BK) oder mechanische Belastung führt im Zusammenhang mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung der eNOS. NO diffundiert in die angrenzenden glatten Muskelzellen und aktiviert die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (sGC), die die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) bewirkt. Über verschiedene Effektorsysteme (Ionenkanäle, Proteinkinasen, Phosphodiesterasen) übt cGMP zelluläre Effekte aus (weiterentwickelte Abbildung nach Libby et al. [23]).

Furchgott und Zawadzki beschrieben 1980, dass die Erschlaffung von Blutgefäßen durch Acetylcholin von einer im Endothel produzierten unbekannten Substanz abhängig ist. Sie bezeichneten diese als "endothelium derived relaxing factor" (EDRF) [24]. Rapoport und Murad konnten daraufhin nachweisen, dass EDRF die cGMP-Synthese in isolierten Blutgefäßen sowie die Proteinphosphorylierung in glatten Muskelzellen steigert [25-26]. Sie vermuteten, dass es sich bei EDRF um einen endogenen Nitro-Vasodilatator handelt [27]. Drei Jahre später stellten

schließlich Ignarro und Moncada unabhängig voneinander die Hypothese auf, dass EDRF mit NO identisch ist [28-29].

Bereits Anfang der 80er Jahre wurde nachgewiesen, dass aus L-Arginin ein Aktivator der löslichen Guanylyl-Cyclase gebildet wird [30]. Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass ein lösliches Enzym in den Makrophagen NO aus der Aminosäure L-Arginin bildet. Es wurde später gereinigt und als NO-Synthase (NOS) bezeichnet [31-33]. Basierend auf diesen Befunden wurde schließlich mit den NO-Synthasen die letzte noch fehlende Komponente des NO / cGMP Signalweges identifiziert. Es dauerte letztlich rund 15 Jahre, um zu verstehen, warum Calciumionen und Acetylcholin zu einer gesteigerten cGMP-Produktion führen (zur Übersicht Abb. 1). Für die Charakterisierung von NO als eines der bedeutendsten Signalmoleküle des Herz-Kreislauf-Systems und die Aufklärung seines Signaltransduktionsweges wurden Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad im Jahr 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet [34-36].

1.1 NO-sensitive Guanylyl-Cyclasen

Der wichtigste Rezeptor für NO ist die ubiquitär exprimierte lösliche oder NO-sensitive Guanylyl-Cyclase, die die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in cGMP und Pyrophosphat katalysiert (Abb. 2). Über die Effektorsysteme des sekundären Botenstoffs cGMP vermittelt die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase eine Vielzahl von physiologischen Funktionen wie zum Beispiel Vasodilatation, synaptische Übertragung und die Hemmung der Thrombozytenaggregation [37].

Die NO-sensitiven Guanylyl-Cyclasen sind aus zwei verschiedenen Untereinheiten einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut. Bisher wurden vier verschiedene Gene identifiziert, die für die Untereinheiten (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase kodieren. Beim Menschen gibt es nur zwei physiologisch wichtige Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, die aus einer β_1 -Untereinheit und einer α_1 - oder α_2 -Untereinheit bestehen und ein katalytisch aktives Heterodimer bilden [38-40].

Die α_1/β_1 Isoform kommt ubiquitär vor und wurde am meisten enzymologisch untersucht. Die α_2/β_1 Isoform dagegen wird spezifisch exprimiert und kommt in hohem Maße im Gehirn und in der Plazenta vor [41-43]. Bei einem Vergleich der

beiden aktiven Isoformen konnten zunächst keine funktionellen Unterschiede nachgewiesen werden [41]. Später konnten Hoffmüller et al. und Russwurm et al. zeigen, dass sich im Carboxyterminus der α_2 -Untereinheit eine Konsensussequenz -RETSL- befindet, die eine Interaktion mit PDZ-Domänen eingehen kann [44-45]. Beispielsweise bindet die α_2 -Untereinheit an eine der drei PDZ-Domänen, des an der Membran von Synaptosomen lokalisierten 'Scaffolding'-Proteins PSD-95 (post-synaptic-density protein von 95 kDa). Die α_2 -Untereinheit kommt damit in die unmittelbare Nähe des NMDA-Rezeptors und der neuronalen NO-Synthase (nNOS), die ebenfalls mit einer der PDZ Domänen von PSD-95 interagieren [46-47, 44-45]. Daher wird eine Beteiligung der α_2/β_1 Isoform an der neuronalen Signaltransduktion an den Synapsen im Gehirn vermutet [45]. Auch für die α_1/β_1 Isoform wurde eine Assoziation mit der Zellmembran, in Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes sowie der zellulären Ca^{2+} -Konzentration, beschrieben [48-49].

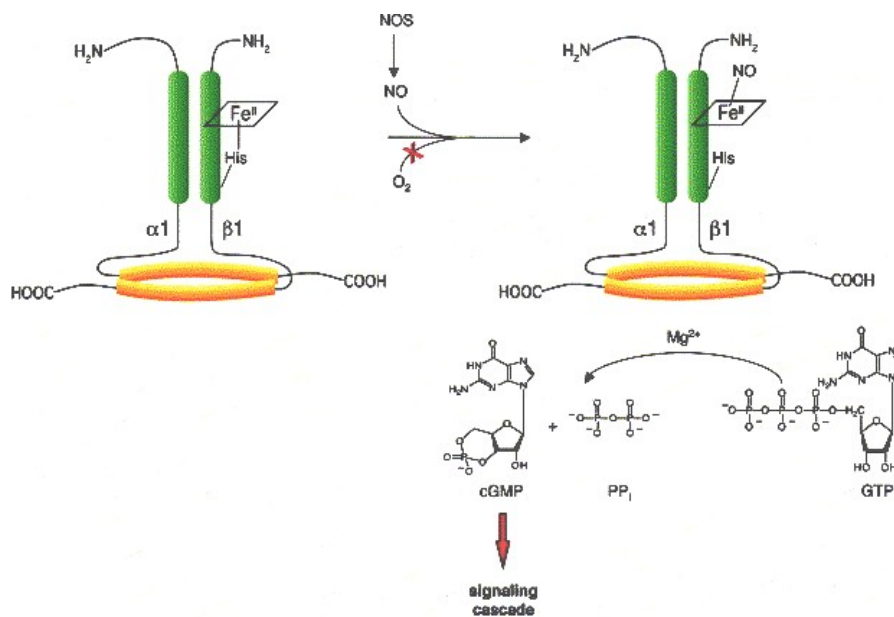


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur und Funktion der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase [50]

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase katalysiert die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und Pyrophosphat. Die Aktivierung des Enzyms erfolgt durch die Bindung von NO an das Histidin 105 in der prothetischen Hämgruppe der β_1 -Untereinheit.

Im Gegensatz zur β_1 -Untereinheit bildet die β_2 -Untereinheit mit den α -Untereinheiten kein aktives Heterodimer. Sie kommt jedoch bei einigen Spezies als Homodimer vor [51-52], und spielt keine wichtige Rolle als endogener Rezeptor für NO [53].

Die Gene für die α_1 - und β_1 -Untereinheit sind beim Menschen auf dem Chromosom 4 lokalisiert, α_1 in der Region q31.1-q31.2 und β_1 in der Region q31.3-q33 [54]. Das Gen für die α_2 -Untereinheit liegt auf dem humanen Chromosom 11 in der Region q21-22 [55]. Nach den Ergebnissen von Behrends et al. ist das Gen für die β_2 -Untereinheit auf dem humanen Chromosom 13 in der Region q14.2-q14.3 lokalisiert [56]. Die α - und β -Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase haben eine begrenzte Homologie in ihrer Sequenz, sie sind aber alle nach dem gleichen Grundprinzip aufgebaut. Jede Untereinheit wurde zunächst in drei Domänen unterteilt: eine aminoterminal regulatorische H-NOX Domäne, eine Dimerisierungsdomäne und eine carboxyterminale katalytische Domäne [57].

Die aminoterminal H-NOX Domäne besteht aus etwa 200 Aminosäuren und bildet die regulatorische hämbindende Domäne [58-61]. Diese hämbindende Domäne der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase ist ein Teil einer Familie von konservierten Proteinen in Prokaryoten und Eukaryoten [58], die aufgrund ihrer Ligandenbindung als Häm - NO und O₂ bindende Familie (Heme-Nitric oxide and OXygen - H-NOX) bezeichnet wird [50]. Für die Bindung von NO an die H-NOX Domäne ist die Hämgruppe am Histidin 105 der β_1 -Untereinheit verantwortlich [62-63]. Die prosthetische Hämgruppe der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zeigt ein Absorptionsmaximum bei 431 nm (Soret-Bande) im UV/Vis-Spektrum [64] und besteht aus einem fünffach koordiniertem Häm mit einem zweiwertigen zentralen Eisenatom und einem Histidin, als axialen Liganden in der fünften Koordinationsbindung [65]. Durch die koordinative Bindung von NO an die sechste Position des zentralen Eisenatoms kommt es zur Ausbildung eines fünffach koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplexes und zur Lösung der Bindung des Hämeisens vom Histidin [66-69]. Das resultierende fünffach koordinierte Nitrosyl-Häm führt zu einer Verschiebung der Soret-Bande auf 398 nm. Die Bindung von NO an die prosthetische Hämgruppe der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase führt zu einer bis zu 400-fachen Aktivierung des angereinigten Enzyms [70-71].

Im Gegensatz zur β_1 -Untereinheit besitzen die H-NOX Domänen der α -Untereinheiten kein Histidin, was an der Hämbindung beteiligt ist. Die Deletion der ersten 259 Aminosäuren der H-NOX Domäne der α_1 -Untereinheit führte zu keiner Veränderung im Absorptionsspektrum des angereinigten Enzyms und zu einem

funktionellen Heterodimer [72]. Auch die Deletion der ersten 247 Aminosäuren der H-NOX Domäne der α_2 -Untereinheit führte zu einem NO-sensitiven Enzym [73]. Die Rolle der aminoterminalen H-NOX Domäne der α -Untereinheiten ist noch nicht geklärt.

Die Dimerisierungsdomäne besteht aus einer H-NOX assoziierten Domäne (H-NOXA) und einer darauf folgenden coiled-coil α -Helix (CC) (Abb. 3). Die H-NOXA bildet in der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase eine Per/Arnt/Sim (PAS) Tertiärstruktur aus [74] und wird deshalb auch als PAS Domäne bezeichnet. PAS Domänen sind in einer Reihe von Proteinen für die Signalweiterleitung, Bindung von kleinen Liganden und für die Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen verantwortlich [75]. Veränderungen in der Aminosäuresequenz der PAS Domäne und coiled-coil α -Helix beeinträchtigen die Heterodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten [76-77, 74].

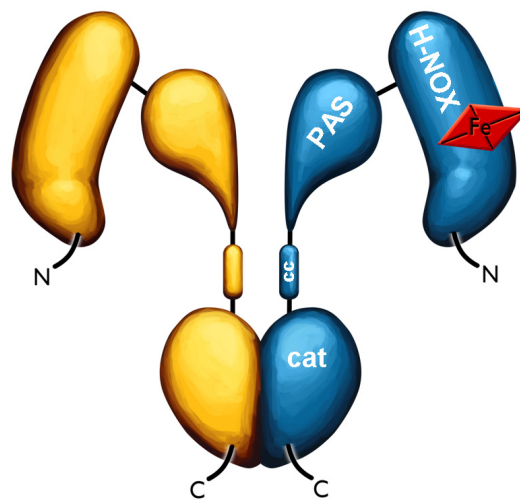


Abbildung 3: Model des NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Heterodimers

Das aktive heterodimere Enzym besteht aus einer β - (blau) und α -Untereinheit (gelb). Alle Untereinheiten sind nach demselben Grundprinzip aufgebaut. Die Untereinheiten weisen im aminoterminalen Bereich eine H-NOX Domäne, eine sich daran anschließende PAS-ähnlichen Domäne, eine darauf folgende coiled-coil α -Helix (cc) und eine carboxyterminale katalytische Domäne (cat) auf. Die PAS Domäne bildet zusammen mit der coiled-coil α -Helix die Dimerisierungsdomäne.

Die katalytischen Domänen am Carboxyterminus der α - und β -Untereinheiten weisen eine hohe Homologie mit den katalytischen Domänen der Adenylyl-Cyclase und der membranständigen Guanylyl-Cyclase auf. Für eine aktive NO-sensitive Guanylyl-Cyclase sind die katalytischen Domänen einer α - und einer β_1 -Untereinheit

notwendig, die zusammen eine katalytisch aktive Substratbindungsstelle und eine katalytisch inaktive, pseudosymmetrische Substratbindungsstelle bilden [78].

1.2 Endogene Aktivatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

Stickstoffmonoxid (NO) ist der wichtigste endogene, physiologische Aktivator der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. NO bindet an die prosthetische Hämgruppe des Enzyms und führt zu einer bis zu 400-fachen Aktivierung der angereinigten NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase [70-71]. Im Organismus wird NO aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff durch die NO-Synthasen (NOS) gebildet. Von den NOS existieren drei Isoformen: die neuronale Isoform (nNOS oder Typ I), die induzierbare Isoform (iNOS oder Typ II), und die endotheliale Isoform (eNOS oder Typ III) [47, 79]. Die neuronale und endotheliale NOS werden konstitutiv exprimiert und durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit einer daraus resultierenden Bildung eines Ca^{2+} / Calmodulin-Komplexes aktiviert [80-81]. Die induzierbare NOS wird vor allem in Zellen des Immunsystems exprimiert und liegt an Calmodulin gebunden vor [80]. Ihre Expression wird durch bakterielle Endotoxine und inflammatorische Zytokine induziert [82], wobei das freigesetzte NO im Rahmen einer Immunantwort unabhängig von cGMP durch die Nitrosylierung von Proteinen und Bildung von oxidativen Stress cytotoxisch auf die Zellen wirkt [83-84]. Als Gas kann NO leicht durch Membranen diffundieren und so als Signalmolekül und freies Radikal agieren.

Auch Kohlenmonoxid (CO) kann an die prosthetische Hämgruppe der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase mit hoher Affinität binden [85]. Allerdings kann CO die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase nur um das 4- bis 6-fache aktivieren. Im Gegensatz zu NO kommt es bei der Bindung von CO zur Bildung eines sechskoordinierten Häm-Komplexes, wobei die Bindung zwischen dem Hämeisen und dem Histidin 105 der β_1 -Untereinheit bestehen bleibt. Der Carbonyl-Häm-Komplex weist ein Absorptionsmaximum bei 423 nm auf. Die physiologische Bedeutung der Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase durch CO und die Rolle von CO als Signalmolekül wird intensiv untersucht und diskutiert [85].

CO wird im Organismus durch den Abbau von Häm über die Hämoxygenasen (HO) gebildet. Die Hämoxygenasen katalysieren mit Hilfe von NADPH und Sauerstoff die

oxidative Spaltung des Protoporphyrinrings des Häms. Dabei entstehen Biliverdin sowie äquimolare Mengen an CO und freiem Eisen. Das Biliverdin wird sofort durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert, wobei CO und Eisen frei zur Verfügung stehen. Zwei Isoformen der Hämoxygenasen sind physiologisch relevant: HO-1 und HO-2. Die beiden Isoformen sind in ihrem Mechanismus des Hämabbaus, der Substrat-Spezifität und der benötigten Kofaktoren [86] gleich, werden jedoch von unterschiedlichen Genen kodiert [87]. Die HO-1 ist die induzierbare Isoform, die zum Beispiel durch Zytokine, oxidativen Stress und bakterielle Lipopolysaccharide induziert wird [86]. Die HO-2 wird konstitutiv exprimiert und ist die vorherrschende Isoform der HO unter physiologischen Bedingungen [86]. Insbesondere wegen der beobachteten Kolo-kalisation von HO-2 und NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase im zentralen Nervensystem wurde vermutet, dass CO als physiologischer Neurotransmitter fungiert [88].

1.3 Modulatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

Zusätzlich zu den endogenen Aktivatoren NO und CO der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase und neben den in der Grundlagenforschung häufig eingesetzten NO-Donoren wie DEA/NO, gibt es weitere Substanzen, die die Enzymaktivität beeinflussen (Abb. 4). Ein selektiver Inhibitor der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase ist ODQ, ein Quinoxalinderivat. In Anwesenheit von ODQ kommt es zu einer Verschiebung der Soret-Bande von 431 nm auf 398 nm durch die Oxidation des Hämeisens in der prothetischen Hämgruppe. Aufgrund der Oxidation des Eisens kann die Aktivierung des Enzyms durch NO nicht mehr erfolgen [89-92]. ODQ zeigt im Gegensatz zu klassischen Inhibitoren wie Methylenblau eine hohe Spezifität und führt zu keiner Inhibition der membranständigen Guanylyl-Cyclase, der Adenylyl-Cyclasen und der NO-Synthasen [89, 92]. Dieser Hemmstoff ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Untersuchung cGMP-abhängiger und cGMP-unabhängiger NO-vermittelter Effekte.

Der erste Stimulator der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, der NO-unabhängig wirkt, wurde 1994 mit dem Indazolderivat YC-1 beschrieben [93]. Es konnte gezeigt werden, dass YC-1 in Abwesenheit von NO die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase um das 12-fache aktiviert [94-96]. Darüber hinaus potenziert YC-1 die maximale Enzymaktivität in Gegenwart von NO oder CO [97, 94-95, 98]. Es wird angenommen,

dass YC-1 die aktive Konformation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase durch eine Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes verstärkt [99-100]. YC-1 benötigt für die Aktivierung - wie auch NO - eine Hämgruppe und ist somit ein hämabhängiger Stimulator der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase [101, 99].

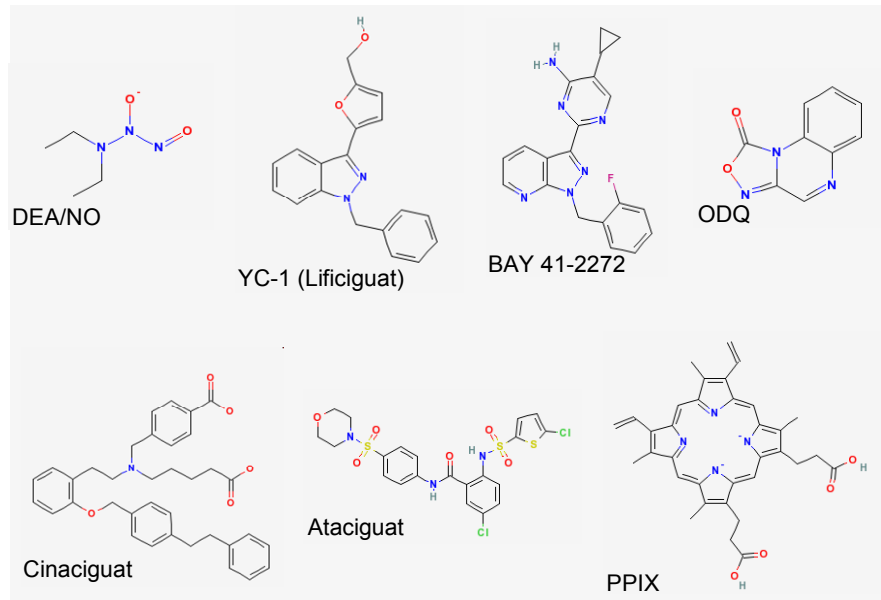


Abbildung 4: Chemische Strukturen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase-Modulatoren

DEA/NO (1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitrosohydrazine) ist ein NO-Donor. YC-1 (3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazol) und BAY 41-2272 (5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine) sind Stimulatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-on) ist ein Hemmstoff der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. Cinaciguat (4-[[[5-hydroxy-5-oxopentyl]-2-[2-[(4-phenethylphenyl)methoxy]phenyl]ethyl]amino]-methyl]benzoic acid) und Ataciguat (5-Chloro-2-[(5-chloro-2-thienyl)sulfonylamino]-N-(4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl)benzamide) sind Aktivatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. Protoporphyrin IX (PPIX) imitiert den fünffach koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex und führt zur Aktivierung des Enzyms.

Der genaue molekulare Aktivierungsmechanismus der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase durch YC-1 wird bisher noch nicht verstanden [102]. Zum einen deuten Mutationsstudien auf eine Interaktion zwischen YC-1 und den katalytischen Domänen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase hin [101, 103-104]. Zum anderen beeinflusst YC-1 aber die spektroskopischen Eigenschaften der Hämgruppe, was auf eine Bindungsstelle des Stimulators in der Nähe der Hämgruppe schließen lässt. Spektroskopische Analysen an einer carboxyterminalen Deletionsmutante der β_1 -Untereinheit (AS 1-385) der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, die keine katalytische Domäne besitzt, zeigte weiterhin eine spektroskopische Veränderung in Anwesenheit von YC-1 [98]. Des Weiteren konnte anhand von Mutationsstudien der α_1 -Untereinheit gezeigt werden, dass der Aminoterminus der α_1 -Untereinheit keine Rolle bei der Aktivierung durch YC-1 spielt [72].

Basierend auf der Struktur von YC-1 entwickelte die Bayer Schering Pharma unter anderem den NO-unabhängigen aber hämabhängigen Stimulator BAY 41-2272, ein Pyrazolopyridin-Derivat. Die Wirkungsweise von BAY 41-2272 ähnelt der von YC-1, aber mit einer erhöhten Potenz und Spezifität für die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase. Ihre vasodilatatorische Potenz ist etwa zwei- bis dreifach höher als die von YC-1 [105-107]. Der Vorteil von BAY 41-2272 gegenüber YC-1 ist außerdem, dass BAY 41-2272 keine relevante Phosphodiesterase (PDE-) Hemmung aufweist [105]. In Abwesenheit von NO stimuliert BAY 41-2272 die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität etwa um das 20-fache [107]. Wie auch bei YC-1 wird die maximale Enzymaktivität durch BAY 41-2272 in Gegenwart von NO verstärkt, basierend auf der Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase [108]. Darüber hinaus verstärkt BAY 41-2272 die CO induzierte spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität auf ein vergleichbares Niveau wie die NO-stimulierte Enzymaktivität [94, 109]. Mittels Photoaffinitätsmarkierung von BAY 41-2272 und der Analyse von Deletionsmutanten der α -Untereinheiten konnte eine Interaktion von BAY 41-2272 mit den α -Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase gezeigt werden [110, 105, 73, 111]. Die genauen Bindungsstellen konnten auch für BAY 41-2272 nicht identifiziert werden [102].

Die direkte Vorstufe des Häms, das Protoporphyrin IX, welches durch den Einbau von zweiwertigem Eisen über die Ferrochelatase zum Häm wird, ist in der Lage die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase NO-unabhängig und unabhängig vom Häm zu aktivieren [112]. Protoporphyrin IX imitiert den fünffach koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex, da es aufgrund des fehlenden zentralen Eisenatoms zu keiner Bindung mit dem Histidin 105 der β_1 -Untereinheit kommt und aktiviert so die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase [113, 101, 99].

Eine weitere Klasse von NO-unabhängigen Aktivatoren bilden Cinaciguat (BAY 58-2667) und Ataciguat (HMR1766), die die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase wie Protoporphyrin IX unabhängig von dem Vorhandensein einer prosthetischen Hämgruppe aktivieren. Diese direkten Guanylyl-Cyclase-Aktivatoren zeigen insofern einzigartige biochemische und pharmakologische Eigenschaften, als sie in der Lage sind, selektiv die oxidierte oder hämfreie NO-sensitive Guanylyl-Cyclase durch die Bindung an die Hämtasche des Enzyms zu aktivieren [114].

Cinaciguat verdrängt in niedrigen Konzentrationen die oxidierte Hämgruppe, durch die weitere Schwächung der Eisen-Histidin-Bindung [115]. In höheren Konzentrationen ist Cinaciguat in der Lage, die reduzierte prosthetische Hämgruppe der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zu verdrängen [116]. Das charakteristische Hämbindungsmotiv der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Tyr-x-Ser-x-Arg ist für die Wechselwirkung mit Cinaciguat erforderlich [60, 116-119]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Cinaciguat den Oxidations-induzierten Abbau der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase verhindert [119]. Somit scheint Cinaciguat der erste pharmakologische Enzymligand zu sein, der sowohl aktivierend als auch proteinstabilisierend wirkt [119].

Obwohl Ataciguat keine strukturelle Ähnlichkeit zu Cinaciguat hat (Abb. 4), wird ein vergleichbarer Aktivierungsmechanismus wie bei Cinaciguat vermutet [120]. Allerdings fehlt die proteinstabilisierende Wirkung bei Ataciguat [119]. Im Unterschied zu Cinaciguat, das die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase schon im nanomolaren Bereich aktiviert [107-108], erreicht Ataciguat erst im mikromolaren Konzentrationsbereich eine Wirkung [121].

1.4 Effektorsysteme von cGMP

Die Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase führt zum Anstieg des intrazellulären Signalmoleküls cGMP. Die zelluläre Antwort auf cGMP wird durch die verschiedenen cGMP Effektorsysteme bestimmt. Einer der wichtigsten Effektoren für cGMP sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen. Weitere Effektoren sind die cGMP-abhängigen Kationenkanälen und cGMP-abhängigen Phosphodiesterasen (PDE). Letztere regulieren den intrazellulären cGMP Spiegel durch die Hydrolyse von cGMP zu GMP [122].

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen sind Serin/Threonin Kinasen. Ihre Aktivierung erfolgt durch die Bindung von cGMP, was die Phosphorylierung verschiedener Zielproteine zur Folge hat. Die phosphorylierten Proteine übertragen letztlich das cGMP Signal in eine bestimmte biologische Funktion. Die meisten Zellen enthalten mindestens eine der drei cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKinasen): cGKI α , cGKI β oder cGKII, die als Homodimere vorliegen [123-127]. Die Dimerisierung ist jedoch keine Voraussetzung für die katalytische Aktivität der cGKinasen [123]. Die

cGKinasen sind in drei funktionelle Domänen unterteilt, in eine aminoternale, eine regulatorische und eine carboxyterminale, katalytische Domäne. Die aminoternale Domäne vermittelt die Dimerisierung und die Interaktion mit den Substratproteinen über ein vorhandenes Leucin-Zipper-Motiv [128]. In der regulatorischen Domäne sind aufeinander folgend die beiden cGMP Bindungsstellen lokalisiert. Die Substratbindungsstelle sowie eine Mg^{2+} -ATP-Bindungsstelle befinden sich in der katalytischen Domäne [129]. Die cGKinasen spielen eine Rolle bei der Vermittlung der cGMP-Wirkung im Herz-Kreislauf-System und bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation [130-132]. Für die cGKII konnte durch Enzym-defiziente Mäuse eine Rolle beim transepithelialen Na^+/Cl^- -Transport im Darm und bei der Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems nachgewiesen werden [130, 133].

Die cyclisch Nukleotid-gesteuerten Kanäle (CNG-Kanäle) sind Ionenkanäle die durch die Bindung von cAMP oder cGMP aktiviert werden. Wie andere Ionenkanäle auch bestehen CNG-Kanäle aus mehreren Untereinheiten. Sie sind aus sechs membranspannenden Segmenten, einer haarnadelförmig in die Membran eintauchenden porenformenden Region und einem hydrophilen intrazellulären Carboxyterminus mit der Bindestelle für cyclische Nukleotide aufgebaut [134-136]. Diese Kanäle sind Kationenkanäle, die nur wenig zwischen den verschiedenen, mono- und divalenten Ionen unterscheiden [137]. Sie lassen sowohl Natrium-, Kalium- als auch Calciumionen ein- oder ausströmen und aktivieren so unterschiedliche Prozesse in den Zellen. CNG-Kanäle spielen eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion des Sehens und der Geruchswahrnehmung [138-139]. Damit sind die CNG Kanäle Effektoren des NO / cGMP Signalweges in Neuronen [140-141]. cGMP-abhängige Kationenkanäle konnten neben der Expression in neuronalen Geweben auch im Herzen, in der Niere, in der Aorta und im Hoden nachgewiesen werden [142-145].

Die Phosphodiesterasen (PDE) sind eine weitere Enzymfamilie, die durch das Signalmolekül cGMP reguliert werden. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe der Ribose und der Phosphatgruppe der intrazellulären Botenstoffe cAMP und cGMP. Auf diese Weise entstehen GMP beziehungsweise AMP, die nach heutigem Kenntnisstand keine bedeutende biologische Aktivität

aufweisen. Die intrazelluläre Konzentration an cGMP wird durch die Phosphodiesterasen bestimmt, die so für die Terminierung der cGMP-vermittelten Signale verantwortlich sind [122, 127]. Nach ihrer Regulation und Nukleotidspezifität werden die Phosphodiesterasen in 11 Subtypen eingeteilt [146, 127]. Von diesen werden durch cGMP die PDE2, PDE5, PDE6 und PDE9 allosterisch reguliert und die PDE3 kompetitiv gehemmt [146]. Die Phosphodiesterasen spielen unter anderem eine Rolle im Herz-Kreislauf-System, in den Nebennieren, bei der Steroidgenese, bei der penilen Erektion und beim Phototransduktionsprozess [147].

2. Zielsetzung und Fragestellung

Während die molekularen Mechanismen der Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase gut untersucht sind, ist über die Expression und Regulation des Enzyms im Gehirn von Ratten während der Entwicklung noch relativ wenig bekannt.

In Untersuchungen, die der hier vorliegenden Arbeit vorangingen, konnte ein Verlust der Enzymaktivität in Homogenaten aus Großhirn von adulten Tieren trotz gleich bleibender oder erhöhter Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten festgestellt werden [148]. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie es zu dieser Diskrepanz zwischen der Enzymaktivität und Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase während der postnatalen Entwicklung im Gehirn von Ratten kommt. Während der Untersuchung stellte sich heraus, dass im Gehirn von adulten Ratten nicht heterodimerisierende Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase existieren. Aus früheren Studien war bekannt, dass die Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase auch im rekombinanten Expressionssystem neben Heterodimeren auch Homodimere bilden [149].

Diese Homodimere sind inaktiv oder wirken hemmend in Bezug auf die katalytische Guanylyl-Cyclase-Aktivität und sollen andere Effekte auf den Zellzyklus [150] und das Zellwachstum [151] haben. Um die unabhängige Untersuchung von homodimeren und heterodimeren Guanylyl-Cyclase-Komplexen in rekombinanten Systemen zu ermöglichen, sollten in einem zweiten Teil der Arbeit Fusionskonstrukte aus den α -Untereinheiten und der β_1 -Untereinheit (NOsGC Fusionkonstrukte) kloniert und charakterisiert werden, die eine 1:1 Stöchiometrie zwischen den α -Untereinheiten und der β_1 -Untereinheit garantieren. Dies sollte die Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase als heterodimer aufgebautem Enzym, ohne Einfluss von nicht heterodimerisierenden Untereinheiten beziehungsweise Homodimeren ermöglichen.

Im Einzelnen lassen sich folgende Ziele abgrenzen:

- Wie kommt es zu der Diskrepanz zwischen Enzymaktivität und Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Rattenhirn während der Entwicklung?
- Lassen sich die Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase unter Erhalt der Enzymaktivität direkt fusionieren?
- Unterscheiden sich die NOsGC Fusionskonstrukte in ihren biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften von den koexprimierten Heterodimeren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Substanzen

| | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| [α - ³² P] -GTP | Hartmann Analytic (Braunschweig) |
| Agar -Agar | Roth (Karlsruhe) |
| Agarose | Roth (Karlsruhe) |
| Aluminiumoxid | Sigma (Deisenhofen) |
| Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat | Sigma (Deisenhofen) |
| Ammoniumpersulfat | Roth (Karlsruhe) |
| Ampicillin | Sigma (Deisenhofen) |
| Ataciguat (HMR 1766) | Sanofi-Aventis (Frankfurt) |
| Avidin | IBA Biotagnology (Göttingen) |
| BAY 41-2272 | Alexis (Lausen, CH) |
| Benzamidin | Fluka (Buchs, CH) |
| Bluo-gal | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Brilliantblau G 250 | Merck (Darmstadt) |
| Bromphenolblau | Merck (Darmstadt) |
| BSA | Roth (Karlsruhe) |
| Calciumchlorid | Roth (Karlsruhe) |
| cGMP | Sigma (Deisenhofen) |
| Cinaciguat (BAY 58-2667) | Bayer Schering Pharma (Wuppertal) |
| GTP | Sigma (Deisenhofen) |
| D-Desthiobiotin | IBA Biotagnology (Göttingen) |
| DEA/NO | Sigma (Deisenhofen) |
| dNTP | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| DMSO | Roth (Karlsruhe) |
| DTT | Roth (Karlsruhe) |
| EDTA | Applichem (Darmstadt) |
| Eisessig | Merck (Darmstadt) |
| Essigsäure (96 %) | Merck (Darmstadt) |
| Ethanol (96 %) | Roth (Karlsruhe) |
| Ethanol (100 %) | Roth (Karlsruhe) |

| | |
|--|------------------------------|
| Ethidiumbromid | Roth (Karlsruhe) |
| Glucose | Roth (Karlsruhe) |
| Glycerin | Roth (Karlsruhe) |
| Glycin | Roth (Karlsruhe) |
| GTP | Sigma (Deisenhofen) |
| HABA | Sigma (Deisenhofen) |
| Hämin | Fluka (Deisenhofen) |
| HCl | Roth (Karlsruhe) |
| Hefe-Extrakt | Roth (Karlsruhe) |
| IBMX | Sigma (Deisenhofen) |
| IPTG | Sigma (Deisenhofen) |
| Isopropanol | Roth (Karlsruhe) |
| Kaliumacetat | Merck (Darmstadt) |
| Kaliumchlorid | Roth (Karlsruhe) |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Roth (Karlsruhe) |
| Kreatinphosphat | Sigma (Deisenhofen) |
| Magnesiumchlorid | Roth (Karlsruhe) |
| β -Mercaptoethanol | Roth (Karlsruhe) |
| Milchpulver | Roth (Karlsruhe) |
| Natriumacetat | Merck (Darmstadt) |
| Natriumcarbonat | Merck (Darmstadt) |
| Natriumchlorid | Roth (Karlsruhe) |
| NaOH | Merck (Darmstadt) |
| Natriumdodecylsulfat | Roth (Karlsruhe) |
| di-Natriumhydrogenphosphat | Roth (Karlsruhe) |
| ODQ | Alexis (Lausen, CH) |
| ortho-Phosphorsäure | Sigma (Deisenhofen) |
| Oxalsäure | Merck (Darmstadt) |
| Perchlorsäure | Merck (Darmstadt) |
| Ponceau S | Sigma (Deisenhofen) |
| Protein A Sepharose CL-4B | GE Healthcare (München) |
| Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) | Roche (Mannheim) |
| Protoporphyrin IX | Sigma (Deisenhofen) |
| Strep-Tactin [®] Superflow [®] high capacity | IBA Biotagnology (Göttingen) |

| | |
|-------------|---------------------|
| TEA/HCl | Sigma (Deisenhofen) |
| TEMED | Roth (Karlsruhe) |
| Tetracyclin | Sigma (Deisenhofen) |
| Tris-HCl | Roth (Karlsruhe) |
| Tris-Acetat | Roth (Karlsruhe) |
| Trypton | Roth (Karlsruhe) |
| Tween20 | Merck (Darmstadt) |
| Xylencyanol | Roth (Karlsruhe) |
| YC-1 | Sigma (Deisenhofen) |
| Zinkacetat | Merck (Darmstadt) |

3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

| | |
|-----------------------------------|--|
| Acryl-/Bisacrylamid – Lösung | Rotiphorese [®] Gel 30 (Roth, Karlsruhe) |
| Blocking-Puffer | 5 % Milchpulver (w/v) in TBST |
| Bradford Reagenz | Roti [®] Quant (Roth, Karlsruhe) |
| 0,1 % Bromphenolblau | (w/v) in IP Probenpuffer |
| Coomassie (sensitive) Färbelösung | 0,02 % Brilliantblau G 250 (w/v); 5 % Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat (w/v); 10 % Ethanol (96 %) (v/v); 2 % ortho-Phosphorsäure (w/v) |
| Coomassie Entfärbelösung | 10 % Ethanol (96 %) (v/v); 2 % ortho-Phosphorsäure (w/v) |
| 6 x DNA-Probenpuffer | 10 mM Tris; 60 mM EDTA; 60 % Glycerin; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol; pH 7,6 |
| DNA Standard | GeneRule [™] 1 kb DNA Ladder; Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Fetales Rinderserum | PAA (Cölbe) |
| Gelfiltrationspuffer | 50 mM TEA, 250 mM NaCl; pH 8,0 |

| | |
|-----------------------------|---|
| Gentamycin | 50 mg/ml; Invitrogen (Karlsruhe) |
| Hirn-Lysispuffer | PBS, 5 mM DTT, PIC, pH 7,4 |
| IEX-1 Puffer | 50 mM TEA; 10 mM DTT; 1 mM Benzamidin; pH 8,0 |
| IEX-2 Puffer | 50 mM TEA; 10 mM DTT; 1 mM Benzamidin; 1 M NaCl; pH 8,0 |
| IP-Lysispuffer | PBS, 1 mM DTT, PIC, pH 7,4 |
| IP-Probenpuffer | 1 % SDS (w/v), 100 mM DTT, 50 mM Tris, 30 % Glycerin (v/v) pH 7,5 |
| IP-Waschpuffer | 50 mM Tris, pH 8,0 |
| Kanamycin | 50 mg/ml; Sigma (Deisenhofen) |
| LB Agar | LB Medium + 1,5 % Agar (w/v) |
| LB Medium | 1 % Trypton (w/v); 0,5 % Hefeextrakt (w/v); 1 % NaCl (w/v); pH 7.0 |
| Lösung I (MiniPrep) | 50 mM Glucose; 25 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0 |
| Lösung II (MiniPrep) | 0,2 M NaOH; 1 % SDS (w/v) |
| Lösung III (MiniPrep) | 3 M Kaliumacetat; 12 % Essigsäure (96%) (v/v) |
| PBS | 1,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 150 mM Natriumchlorid; 5,2 mM di-Natriumhydrogenphosphat; pH 7,4 |
| Penicillin /Streptomycin | 100 x; PAA (Cölbe) |
| Ponceau S Färbelösung | 0,5 % Ponceau S (w/v); 1 % Eisessig (v/v) |
| Proteinstandard | PageRuler™ unstained; Fermentas (St. Leon-Rot) |

| | |
|---------------------------|--|
| 5 % Sammelgel (2 Gele) | 2,9 ml Reinstwasser 5 ml 2 x Sammelgelpuffer 2 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung 6 µl TEMED 120 µl 10 % Ammoniumpersulfat |
| 2 x Sammelgelpuffer | 0,25 M Tris; 0,2 % SDS (w/v); pH 6,8 |
| 10 x SDS Laufpuffer | 0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS (w/v); pH 8,3-8,8 |
| 2 x SDS Probenpuffer | 0,15 M Tris; 1,2 % SDS (w/v); 30 % Glycerin (v/v); 15 % β-Mercaptoethanol (v/v); 0,018 % Bromphenolblau (w/v); pH 6,8 |
| Sf-900II SFM-Medium | Invitrogen (Karlsruhe) |
| SOC Medium | 1 % Tryptone (w/v); 0,5 % Hefeextrakt (w/v); 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose |
| Strep-Waschpuffer | 100 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 10 mM DTT; pH 8,0 |
| Strep-Elutionspuffer | 100 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 10 mM DTT, 2,5 mM D-Desthiobiotin; pH 8,0 |
| Strep-Regenerationspuffer | 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA; pH 8,0 |
| TAE Puffer | 40 mM Tris-Acetat; 0,1 mM EDTA; pH 8,0 |
| 10 x TBST | 1,5 M NaCl; 100 mM Tris; 1 % Tween 20 (v/v) |
| TEA Lysispuffer | 50 mM TEA; 1 mM EDTA; 10 mM DTT; PIC; pH 7,4 |
| 10 x Transferpuffer | 0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 0,2 % SDS (w/v); pH 8,3 |
| 4 x Trenngelpuffer | 1,5 M Tris; 0,4 % SDS (w/v); pH 8,8 |

| | |
|-----------------------|---|
| 8 % Trenngel (2 Gele) | 7 ml Reinstwasser 3,75 ml 4 x Trenngelpuffer 4 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung 15 µl TEMED 150 µl 10 % Ammoniumpersulfat |
|-----------------------|---|

3.1.3 Stammlösungen

| | |
|--------------------------------|---------------------|
| 10 mM Ataciguat (HMR 1766) | in 100 % (v/v) DMSO |
| 1 mM BAY 41-2272 | in 25 % (v/v) DMSO |
| 10 mM Cinaciguat (BAY 58-2667) | in 100 % (v/v) DMSO |
| 10 mM DEA/NO | in 10 mM NaOH |
| 1 mM ODQ | in 25 % (v/v) DMSO |
| 10 mM Protoporphyrin IX | in 10 mM NaOH |
| 3 mM YC-1 (Lifiguat) | in 25 % (v/v) DMSO |

3.1.4 Vektoren

| | |
|----------------------|------------------------|
| pCR2.1-TOPO | Invitrogen (Karlsruhe) |
| pcDNA3.1/V5/His-TOPO | Invitrogen (Karlsruhe) |
| pFASTBAC-1 | Invitrogen (Karlsruhe) |
| pECFP-N1 | Clontech (Heidelberg) |
| pEGFP-N1 | Clontech (Heidelberg) |
| pEYFP-C1 | Clontech (Heidelberg) |
| pEYFP-N1 | Clontech (Heidelberg) |
| pUC18 | NEB (Schwalbach) |

3.1.5 Oligonukleotide

α_1 _sense_BsrGI (P270)

5' gat cgt gta caa gat gtt ctg cag gaa gtt caa ag-3'

α_1 _antisense_STOP_XbaI (P269)

5' gat cgt cta gat taa tct acc cct gag gcc ttg cc-3'

α_1 _STREP_sense_BstEII (P289)

5' agc agc tct ggc aag gac aaa t- 3'

α_1 _STREP_antisense_XbaI (P290)

5' tct aga tta ttt ttc gaa ctg cgg gtg gct cca atc tac ccc tga ggc ctt gcc taa g-3'

α_2 _STREP_sense_NheI (P280)

5' aag acc cat tca gat gcg gat agg- 3'

α_2 _STREP_antisense (P281)

5' tta ttt ttc gaa ctg cgg gtg gct caa gag gct agt ttc tcg gag gaa cat cg-3'

3.1.6 Enzyme und Reagenziensysteme

| | |
|--|--------------------------|
| Cellfectin [®] | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Kreatin-Kinase | Sigma (Deisenhofen) |
| Lumi-Light ^{Plus} Western-Blot Substrat | Roche (Mannheim) |
| Mung Bean Nuclease | NEB (Schwalbach) |
| Pfu-turbo DNA Polymerase | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| HiPure Plasmid Maxi Prep [®] Kit | Invitrogen (Karlsruhe) |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen (Hilden) |
| RNase A | Sigma (Deisenhofen) |
| T4 DNA Ligase | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Taq DNA Polymerase | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| TOPO-TA Klonierungsreagenziensystem | Invitrogen (Karlsruhe) |

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von NEB (Schwalbach) bezogen.

3.1.7 Antikörper

Kaninchen anti- β_1 sGC Antikörper (1:4000) von Sigma (Deisenhofen)

Kaninchen anti- α_1 sGC Antikörper (1:5000) von Sigma (Deisenhofen)

Kaninchen anti- α_2 sGC Antikörper (1:750) [42]

Kaninchen anti-Aktin Antikörper (1:500) von Sigma (Deisenhofen)

Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-linked Antikörper (1:2000) von Cell Signalling (Schwalbach)

Maus anti-GFP Antikörper (1:1000) von Roche (Mannheim)

3.1.8 Zellen

3.1.8.1 Bakterienstämme

Max Efficiency® DH10 BAC™ Competent Cells (Invitrogen)

F. mcrA Δ .(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15
 Δ *lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*)7697*galU*
galK λ .*rpsL nupG* /pMON14272 / pMON7124*

One Shot® TOP 10 kompetente Zellen (Invitrogen)

F. mcrA Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15
 Δ *lacX74 deoRrecA1araD139 Δ (*ara, leu*)7697*galU galK*
*rpsL endA1 nupG**

dam⁻/*dcm*⁻ Competent *E. coli* (NEB)

ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2
galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)
Tet^S *endA1 rspL136* (*Str*^R) *dam13::Tn9* (*Cam*^R) *xyIA-5*
mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2

3.1.8.2 Eukaryotische Zelllinien

Sf9-Zellen (Invitrogen)

3.1.9 Tierhaltung und Organentnahme

Bei den verwendeten Versuchstieren handelt es sich um Wistar (CrI:WI) Ratten, die aus dem Labor Charles River Deutschland GmbH stammen und in der Zentralen Einrichtung für Tierhaltung der TU Braunschweig gehalten und gezüchtet wurden.

Die Tiere wurden in Polycarbonatkäfigen, die mit einem Edelstahldeckel und mit durchgehender Futterraufe versehen waren, auf Standardeinstreu (Abedd LTE E-001) für Labortiere auf konventionelle Art mit Trockenbarriere gehalten. In der Versuchstieranlage betrug die Raumtemperatur 22 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit 60 ± 10 %. Der Tag-Nachtzyklus betrug 12 Stunden, wobei die Tagphase von 6:30 Uhr bis 18:30 Uhr andauerte. Futter (Ssniff V1534-000 R/M-H 10 mm) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Die adulten, 90-120 Tage alten Ratten wurden in einer CO₂-Kammer getötet. Neonatale Ratten, 1-5 Tage alt, wurden mittels Enthauptung getötet. Unmittelbar danach wurden Kleinhirn und Großhirn präpariert, anschließend in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die durchgeführte Tötung der Tiere war im Einklang mit der Erklärung von Helsinki und durch die Ethik-Kommission der Technischen Universität Braunschweig genehmigt (unsere Rattenversuchsnummer §4(01.07)TschB TUBS).

3.1.10 Hilfsmittel und Geräte

| | | |
|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Äkta | Purifier™ | GE Healthcare (München) |
| Agarosegelkammern | SciePlas | Herolab (Wiesloch) |
| Analysenwaage | PT210 | Sartorius (Göttingen) |
| Brutschrank (<i>E.coli</i>) | Kelvitron®t | Heraeus (Hanau) |
| Brutschrank (Sf9) | Stabilitherm | Thermo (Waltham, USA) |
| CO ₂ -Inkubator | InCusafe | Sanyo (Bad Nenndorf) |
| Digitalwaage | BP210D | Sartorius (Göttingen) |
| ECL Dokumentationsanlage | ChemiLux | Intas (Göttingen) |
| Elektrophorese-Apparatur | Mini-PROTEAN | Biorad (München) |
| Filterpapier | 3MM | Biorad (München) |
| Gefrierschränke | -20 °C | Liebherr (Ochsenhausen) |
| Geldokumentationssystem | Gel IX Imager | Intas (Göttingen) |
| Geltrockner | Modell 583 | Biorad (München) |
| Kühlschränke | 4 °C | Liebherr (Ochsenhausen) |
| Kühltruhe | -80 °C | GFL (Burgwedel) |
| Leersäule für die Äkta | C 10/10 Tricorn 10/20 | GE Healthcare (München) |
| Magnetrührer | KMO2 basic | IKA (Staufen) |
| Mikroskop | invers, ID03 | Zeiss (Jena) |
| Nitrocellulose | Protran, 0,45 µm | Roth (Karlsruhe) |
| pH-Meter | 766 Calimatic | Knick (Berlin) |
| Pipetten | P10, P20, P100, P200, P1000 | Gilson (Middleton, USA) |
| Pipettierhilfen | pipetus® akku | Hirschmann (Eberstadt) |
| Power Supply | PowerPac300 | Biorad (München) |

| | | |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| Power Supply | EV231 | Peq Lab (Erlangen) |
| Reinraumwerkbank | Herasafe | Heraeus (Hanau) |
| Reinstwasseranlage | Ultra Clear | SG (Barsbüttel) |
| Schüttelinkubator (Sf9) | Excella E24 | New Brunswick (Edison, USA) |
| Schüttelinkubator (<i>E.coli</i>) | Innova 4300 | New Brunswick (Edison, USA) |
| Semi-Dry Elektroblotter | Sedec™ M | Peq Lab (Erlangen) |
| Spektrofluorometer | Cary Eclipse | Varian (Palo Alto, USA) |
| Spritzen | 20 ml; 60 ml | B.Braun (Melsungen) |
| Spritzensterilfilter | 0,45 µm; 0,2 µm | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Szintillationsgefäße | 20 ml | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Szintillationszähler | LS 6500 | BeckmanCoulter (Palo Alto, USA) |
| Thermocycler | Primus advanced | Peqlab (Erlangen) |
| Thermomixer | compact | Eppendorf (Hamburg) |
| Tischzentrifuge | Fresco 21 | Thermo (Waltham, USA) |
| Ultraschall-Homogenisator | Sonoplus | Bandelin (Berlin) |
| UV-Visible Spektrophotometer | Cary Scan 50 | Varian (Palo Alto, USA) |
| UV-Visible Spektrophotometer | Nanophotometer | Implen (München) |
| Vortexer | MS3 basic | IKA (Staufen) |
| Wasserbad | Typ 1003 | GFL (Burgwedel) |
| Zentrifuge | Multifuge IS-R | Thermo (Waltham, USA) |
| Zentrifuge | Meagfuge 1.0R | Heraeus (Hanau) |

Sämtliche Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur und für die Routinearbeiten wurden von Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Klonierung von DNA in Plasmidvektoren

Zur Linearisierung der Vektoren und zur Isolierung von DNA Fragmenten wurden spezifische Restriktionsendonukleasen verwendet. Die Restriktion der DNA wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen und mit den mitgelieferten Puffersystemen durchgeführt. In den Restriktionsanalysen wurden 0,5-1 µg DNA und für einen präparativen Restriktionsenzymverdau wurden 5 µg DNA eingesetzt.

Lagen keine geeigneten Restriktionsschnittstellen vor, wurde das entsprechende DNA Fragment mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden mit der gewünschten Restriktionsstelle amplifiziert. Bei der PCR werden definierte DNA Sequenzen spezifisch durch thermostabile *Taq* DNA-Polymerasen unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen und mit den mitgelieferten Puffersystemen vermehrt.

Um bei der Klonierung eine Selbstligation des linearisierten Vektors mit kompatiblen Enden zu vermeiden, wurden im Anschluss an die Restriktion die 5'-Phosphatreste der DNA-Enden mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase nach Herstellerangaben entfernt. Erforderte die Klonierungsstrategie das Erzeugen von glatten Enden („Blunt Ends“) durch das Auffüllen von 5'-überhängenden Enden, so wurden dem Reaktionsansatz 1,25 U *Pfu* DNA-Polymerase, 0,4 mM dNTP-Mix, sowie die benötigte Menge des mitgelieferten Reaktionspuffers hinzugegeben. Der gesamte Ansatz wurde für die Auffüllreaktion 30 min bei 72 °C inkubiert.

Im Anschluss wurden die DNA Fragmente mit DNA Probenpuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt [152]. Die Agarose wurde in einer Endkonzentration von 1 % (w/v) in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml hinzugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V in einer Horizontalelektrophoresekammer mit TAE als Laufpuffer. Die DNA Fragmente wurden mit einer UV-Lampe bei 254 nm sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem Gel IX Imager™ dokumentiert. Anhand eines mitgeführten DNA-Standards wurden ihre Größen bestimmt. Die gewünschten DNA-Banden wurden mit dem sie umschließenden Gel herausgetrennt, um die DNA mit Hilfe eines Gelextraktionsreagenziensystems (QIAquick Gel Extraction Kit - Qiagen) nach Herstellerangaben zu isolieren.

Bei der Ligation wird ein DNA Fragment über kompatible Enden mit der linearisierten Vektor-DNA verbunden, so dass ein zirkuläres DNA-Molekül entsteht. Die Bildung neuer Phosphodiesterbindungen wird von Ligasen katalysiert. In einem Kontrollansatz wurde lediglich Vektor-DNA mit Ligase behandelt, um die Religationsergebnisse der Vektor-DNA zu überprüfen. In weiteren Ansätzen wurde

ein konstantes Volumen (in der Regel 2 μ l der Agarose-Gelelution) der linearisierten Vektor-DNA mit steigenden Mengen der zu klonierenden DNA-Fragmente gemischt, um die Ligationseffizienz zu kontrollieren. Die Ligation erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen.

3.2.1.1 Klonierung fluoreszenzmarkierter NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase Untereinheiten

Als Ausgangsprodukt für die Klonierung von β_1 YFP diente β_1 aus pcDNA3.1/V5/His-TOPO [153]. Die β_1 -Untereinheit wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und ApaI aus dem pcDNA3.1/V5/His-TOPO Vektor isoliert und in pEYFP-N1 Vektor, der mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut worden war, mittels Ligation eingefügt.

Für die Klonierung von α_1 YFP diente als Ausgangsprodukt α_1 aus dem pcDNA3.1/V5/His-TOPO Vektor [153]. Die α_1 -Untereinheit wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XhoI aus dem pcDNA3.1/V5/His-TOPO Vektor isoliert und in den ebenfalls mit HindIII und SalI geschnittenen pEYFP-N1 Vektor ligiert.

Die Klonierung von α_2 YFP erfolgte in mehreren Schritten. Als Ausgangsprodukt diente α_2 aus pFASTBAC-1 [154]. Die α_2 -Untereinheit wurde mit den Restriktionsendonukleasen SspI und BamHI aus dem pFASTBAC-1 Vektor isoliert und in pEGFP-N1 der mit den Restriktionsendonukleasen BglII und BamHI verdaut worden war, mittels Ligation eingefügt. Zuvor wurden die 5'-überhängenden-Enden der BglII Schnittstelle mit Hilfe der *Pfu* DNA-Polymerase aufgefüllt, wodurch glatte Enden entstanden. Aus diesem Vektor wurde die α_2 -Untereinheit mit den Restriktionsendonukleasen Eco47III und NotI ausgeschnitten und in pECFP-N1 ligiert. ECFP wurde durch EYFP aus dem pEYFP-C1 Vektor mit den Restriktionsendonukleasen AgeI und KpnI ausgetauscht.

3.2.1.2 Klonierung des $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstruktes

Als Ausgangsprodukt für die Klonierung des $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstruktes dienten β_1 YFP in pEYFP-N1 und α_1 in pcDNA3.1/V5/His-TOPO. Mittels PCR wurde die α_1

Nukleotidsequenz in dem Vektor pcDNA3.1/V5/His-TOPO mit Oligonukleotiden amplifiziert, die zusätzlich Restriktionsschnittstellen enthielten. Für das 5'-Ende wurde der Primer α_1 _sense_BsrGI (P270), der eine Restriktionsschnittstelle für BsrGI enthält, und für das 3'-Ende der Primer α_1 _antisense_STOP_XbaI (P269), der eine Restriktionsschnittstelle für XbaI enthält, konstruiert. Die PCR wurde mit 30 Zyklen (30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C und 3 min 72 °C) durchgeführt. Das 2097 bp große PCR Produkt wurde im Anschluss mittels TOPO-TA Klonierungsreagenziensystem in den pCR2.1-TOPO Vektor nach Herstellerangaben kloniert. Die α_1 -Untereinheit wurde mit den Restriktionsendonukleasen BsrGI und XbaI aus dem pCR2.1-TOPO Vektor isoliert und zu β_1 YFP im pEYFP-N1 Vektor, der mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelt wurde, mittels Ligation eingefügt. Das entstandene β_1 YFP α_1 Konstrukt in pEYFP-N1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen BsrGI und ApaI behandelt und so das 709 bp große Fragment, das für EYFP kodiert, entfernt. Nach einer Behandlung mit einer Nuklease aus der Mungo Bohne (Mung Bean) nach Herstellerangaben zur Erzeugung von glatten Enden, erfolgte die Religation des $\beta_1\alpha_1$ Konstruktes in pEYFP-N1.

3.2.1.3 Klonierung des $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstruktes

Die Klonierung des $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstruktes erfolgte in mehreren Schritten. Als Ausgangsprodukt diente α_2 aus pFASTBAC-1 und β_1 YFP in pEYFP-N1. Die α_2 -Untereinheit wurde mit den Restriktionsendonukleasen BstEII und BamHI aus dem pFASTBAC-1 Vektor [154] isoliert und in pEYFP-C1, der mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI behandelt wurde, mittels Ligation eingefügt. Zuvor wurden die 5'-überhängenden-Enden der BstEII und EcoRI Schnittstellen mit Hilfe der *Pfu* DNA-Polymerase aufgefüllt, wodurch glatte Enden entstanden. Aus dem entstandenen YFP α_2 in pEYFP-C1 wurde das 731 bp große EYFP Fragment mit den Restriktionsendonukleasen BsrGI und NheI isoliert und durch das 2684 bp große β_1 YFP Fragment aus pEYFP-N1, ebenfalls mit BsrGI und NheI behandelt, ersetzt. Das entstandene β_1 YFP α_2 Konstrukt in pEYFP-N1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen AgeI und BspEI behandelt und so das 730 bp große EYFP Fragmente entfernt. Nach einer Behandlung mit *Pfu* DNA-Polymerase zur Erzeugung von glatten Enden, durch das Auffüllen der 5'-Überhänge der Restriktionsschnittstellen, erfolgte die Religation des $\beta_1\alpha_2$ Konstruktes in pEYFP-N1.

3.2.1.4 Klonierung eines STREptag II an die α_1 - und α_2 -Untereinheit

Für die Markierung der α_1 - und α_2 -Untereinheit wurde mittels PCR an das 3'-Ende der α -Untereinheiten die Nukleotidsequenz für den STREptag II eingefügt. Es wurde jeweils nur der carboxyterminale Bereich der α -Untereinheiten mit dem STREptag II amplifiziert. Als Ausgangs-DNA (template) wurden α_1 in pFASTBAC-1 [155] und α_2 in pFASTBAC-1 [154] eingesetzt.

Für die α_1 -Untereinheit wurden für das 5'-Ende das Oligonukleotid α_1 _STREP_sense_BstEII (P289), das eine Restriktionsschnittstelle für BstEII enthält, und für das 3'-Ende das Oligonukleotid α_1 _STREP_antisense_XbaI (P290), das die Nukleotidsequenz des STREptag II und eine Restriktionsschnittstelle für XbaI enthält, konstruiert. Die PCR wurde mit 30 Zyklen (30 sec 95 °C, 30 sec 63°C und 1 min 72 °C) durchgeführt. Das 684 bp große PCR Produkt wurde im Anschluss mit Hilfe des TOPO-TA Klonierungsreagenziensystem in den pCR2.1-TOPO Vektor nach Herstellerangaben kloniert. Das STREptag II markierte Ende der α_1 -Untereinheit aus dem pCR2.1-TOPO Vektor wurde mit dem unmarkierten Ende der α_1 -Untereinheit aus dem $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt aus dem pFASTBAC-1 (beschrieben unter 3.3.3.1) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen BstEII und XbaI ausgetauscht. Für die Klonierung des STREptag II an die einzelne α_1 -Untereinheit wurde aus dem entstandenen $\beta_1\alpha_1$ S Fusionskonstrukt im pFASTBAC-1 mit den Restriktionsendonukleasen SpeI und BstEII die β_1 -Untereinheit und der Anfang der α_1 -Untereinheit entfernt und durch den Anfang der α_1 -Untereinheit aus dem pCR2.1-TOPO Vektor, ebenfalls mit SpeI und BstEII behandelt, ersetzt.

Für die α_2 -Untereinheit wurden für das 5'-Ende das Oligonukleotid α_2 _STREP_sense_NheI (P280), das eine Restriktionsschnittstelle für NheI enthält, und für das 3'-Ende das Oligonukleotid α_2 _STREP_antisense (P281), das die Nukleotidsequenz des STREptags II enthält, konstruiert. Die PCR wurde mit 30 Zyklen (30 sec 95 °C, 30 sec 63°C und 1 min 72 °C) durchgeführt. Das 400 bp große PCR Produkt wurde im Anschluss mittels des TOPO-TA Klonierungsreagenziensystems in den pCR2.1-TOPO Vektor nach Herstellerangaben kloniert. Das STREptag II markierte Ende der α_2 -Untereinheit aus dem pCR2.1-TOPO Vektor wurde mit dem unmarkierten Ende der α_2 -Untereinheit aus dem $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstrukt im pFASTBAC-1 (beschrieben unter 3.3.3.1) mit Hilfe der

Restriktionsendonukleasen NheI und NotI ausgetauscht. Für die Klonierung des STREPTag II an die einzelne α_2 -Untereinheit wurde aus dem entstandenen $\beta_1\alpha_2$ S Fusionskonstrukt im pFASTBAC-1 mit den Restriktionsendonukleasen NheI und BssHII die β_1 -Untereinheit und der Anfang der α_2 -Untereinheit entfernt und durch den Anfang der α_2 -Untereinheit aus dem pFASTBAC-1 Vektor [154], ebenfalls mit NheI und BssHII behandelt, ersetzt.

3.2.1.5 Klonierung eines STREPTag II an die β_1 -Untereinheit

Für die Klonierung einer STREPTag II markierten β_1 -Untereinheit wurde das YFP aus β_1 YFP im pFASTBAC-1 Vektor (beschrieben unter 3.3.3.1) mit den Restriktionsendonukleasen SmaI und PvuI entfernt und die Nukleotidsequenz des STREPTag II aus dem $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt in pFASTBAC-1 mit StuI und PvuI mittels Ligation eingefügt.

3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch Behandlung von *E.coli*-Zellen mit CaCl_2 [156] können diese in einen transienten Zustand der „Kompetenz“ übergehen, währenddessen sie fremde DNA-Moleküle aufnehmen können. Für die Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen wurden 100 ml LB Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert bis eine OD_{595} von 0,6 erreicht wurde. Bei dieser optischen Dichte wurden die Bakterien für 15 min auf Eis gestellt. Dann wurden sie in 50 ml Röhrchen bei 4500 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 25 ml einer eiskalten 100 mM CaCl_2 Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte erneut eine Zentrifugation für 5 min bei 4500 rpm und 4 °C. Die sedimentierten Zellen wurden in je 10 ml eiskalter CaCl_2 /Glycerin Lösung (100 mM / 20 %) resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden dann zu je 250 μl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Chemisch kompetente Zellen wurden vor der Benutzung durch die Transformation mit dem pUC18 Plasmid (NEB) und Wasser als Negativ Kontrolle auf Kompetenz und mögliche Kontaminationen untersucht.

3.2.3 Transformation von DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte durch kurzes Erhitzen auf 42 °C, wodurch die Bakterienzellwand durchlässig für hochmolekulare DNA Moleküle wird. Die Plasmid-DNA, deren Aufnahme dem Bakterium aufgrund der damit erworbenen Antibiotika-Resistenz einen Selektionsvorteil bringt, kann so unabhängig von chromosomaler DNA repliziert werden.

100 µl chemisch kompetente Zellen wurden mit 10 µl Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 30 sec auf 42 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Danach wurde der Transformationsansatz mit 250 µl SOC Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C und 800 rpm im Heizblock inkubiert. Je 300 µl wurden dann auf geeigneten, antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.2.4 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli* Kulturen

Die gängigste Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* ist die Alkalische Lyse Methode nach Birnboim und Doly [157]. Als Ausgangskulturen zur Plasmidisolierung in kleinem Maßstab dienten 2 ml einer Übernachtskultur. Die sedimentierten Bakterien, wurden zunächst in 100 µl eines neutralen Puffers (Lösung I) und 2 µl RNase (1 mg/ml) resuspendiert und für 10 min inkubiert. Durch die Zugabe von 200 µl einer stark alkalischen Lösung mit dem ionischen Detergenz SDS wurden die Bakterien lysiert (Lösung II) und erneut für 10 min inkubiert. Da sich die beiden kovalent verbundenen Einzelstränge der Plasmid-DNA aufgrund des Supercoiling nicht voneinander trennen können, lagern sie sich bei der anschließenden Neutralisation der Lösung durch die Zugabe von 150 µl Lösung III wieder komplett zusammen. Durch den gleichzeitigen Austausch von Natrium- durch Kaliumionen, fallen die denaturierten Proteine und die chromosomale DNA als Komplex mit SDS aus und können bei 21000 x g für 15 min abzentrifugiert werden. Aus dem Überstand kann dann die Plasmid-DNA durch Zugabe von 450 µl Isopropanol und 45 µl Natriumacetat pH 4,8 ausgefällt und bei 21000 x g für 30 min abzentrifugiert werden. Nach Waschen mit 70 % Ethanol und Trocknen der DNA, wird diese in Reinstwasser gelöst und kann dann für weitere Experimente, z.B. die Restriktionsanalyse, genutzt werden.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab wurde das HiPure Plasmid Maxi Prep[®] Reagenziensystem der Firma Invitrogen genutzt. Dazu wurde Plasmid-DNA aus 200 ml Übernachtskulturen über Affinitätssäulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.5 Analyse der präparierten Plasmid-DNA

Die DNA Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch durch Extinktionsmessungen bei 260 nm ermittelt. Ein Extinktionswert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Wird gleichzeitig die Extinktion bei 280 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, so kann aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm zu 280 nm (OD_{260} / OD_{280}) die Reinheit der DNA-Probe bestimmt werden. Reine DNA weist einen Quotienten der OD_{260} / OD_{280} zwischen 1,80 und 2,0 auf.

Die Erstanalyse der isolierten Plasmid-DNA erfolgte nach der Präparation kleiner DNA Mengen mittels Restriktionsendonukleasen. Die Auswahl einer geeigneten Kombination von verschiedenen Endonukleasen wurde so durchgeführt, dass anhand der sich anschließenden Agarose-Gelelektrophorese eindeutig festgestellt werden konnte, ob das zu klonierende DNA-Fragment in der korrekten Orientierung in den Vektor inseriert wurde. Prinzipiell wurde ebenso bei der Analyse der Plasmid-DNA nach der Präparation größerer DNA-Mengen verfahren. Hierbei wurden möglichst viele verschiedene Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um so eine umfassende Kontrolle des klonierten Plasmids zu erhalten. Für eine detaillierte Untersuchung der Plasmide wurde die DNA bei der Firma GATC (Konstanz) sequenziert. Die von GATC ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe der Computerprogramme CLC Sequence Viewer und Bioedit ausgewertet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur

3.3.1 Proteinisolierung aus Gewebe

Die Rattenhirnproben wurden im gefrorenen Zustand unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert. Das Gewebepulver wurde

anschließend in Hirn- oder IP-Lysispuffer – 4 µl Puffer je 1 mg Gewebe – mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflon Pistill mit 10 Hüben homogenisiert.

Durch die Zentrifugation bei 2800 x g für 10 min bei 4 °C wurden die Zellkerne und restlichen Gewebestandteile abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Membranen für 30 min bei 4 °C und mit 21000 x g von der cytosolischen Fraktion abgetrennt. Die cytosolische Fraktion wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Membranfraktion anschließend in einem geeigneten Volumen Hirn-Lysispuffer resuspendiert. Für die Untersuchungen an Hirnhomogenaten wurde nur eine kurze Zentrifugation für 10 min bei 13000 x g und 4 °C durchgeführt und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

3.3.2 Bestimmung der Hämkonzentration von Hämoproteinen im Rattenhirn

Die Bestimmung der Hämkonzentration erfolgte nach der fluorometrischen Methode von Morrison [158]. Das Prinzip beruht auf der Umwandlung des Häms zum fluoreszierenden Porphyrin, durch die Entfernung des Eisens unter sauren reduzierenden Bedingungen.

Die Rattenhirnproben wurden im gefrorenen Zustand unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert. Das Gewebepulver wurde anschließend in 1,8 M Oxalsäure – 4 µl Puffer je 1 mg Gewebe – mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflon Pistill mit 10 Hüben homogenisiert. Die homogenisierten Hirnproben wurden im Anschluss für 30 min bei 100 °C gekocht. Ungekochte Proben wurden als Leerwert mitgeführt, um die endogen vorhandenen Porphyrine zu bestimmen. Als Standardproteine wurden definierte Lösungen von 1 nM bis 1000 nM Hämin verwendet, die wie die Hirnproben behandelt wurden. Nach Abkühlung der Proben erfolgte eine Zentrifugation bei 21000 x g für 30 min und 4 °C, um Zellkerne, restliche Gewebestandteile und Oxalsäurekristalle zu entfernen. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Cary Eclipse Spektrofluorophotometers bestimmt, bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emission von 662 nm.

3.3.3 Herstellung rekombinanter Proteine im Baculovirus-Expressionssystem

Das Baculovirus-Expressionssystem (BVES) ist eines der leistungsfähigsten und vielseitigsten eukaryotischen Expressionssysteme [159]. Die zur Expression von rekombinantem Protein eingesetzten Baculoviren sind doppelsträngige, zirkuläre DNA-Viren, die spezifisch Insektenzellen infizieren.

Die gentechnische Bedeutung der Baculoviren liegt in der Fähigkeit, während einer Infektion das Strukturprotein Polyhedrin in sehr großen Mengen zu produzieren. Ersetzt man dieses virale Gen gegen ein fremdes Gen, wird nun das Fremdprotein anstelle des viralen Proteins in großer Menge exprimiert. Alle für eukaryotische Proteine notwendigen posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Glycosylierung erfolgen im BVES. Ein häufig für die rekombinante Expression von Proteinen verwendeter Vertreter ist der AcMNPV-Virus (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*). Das Genom der Baculoviren ist sehr klein (AcMNPV: 128 kb), dadurch gibt es keine direkte Möglichkeit die Fremd-DNA in das Virus Genom zu integrieren. Zur Integration der gewünschten cDNA in das Virus-Genom werden die entsprechenden DNA-Sequenzen zunächst in den Donor Plasmid-Vektor pFASTBAC-1 kloniert. Das rekombinante Plasmid wurde anschließend in spezielle kompetente *E.coli*-Zellen (Subtyp DH10BAC) transformiert. Diese *E.coli*-Zellen enthalten Bacmid-DNA und ein Helfer-Plasmid. Sie kodieren die Proteine für die Transposition, die eine Rekombination des einklonierten Gens des Donor-Plasmids mit dem Bacmid unterstützen. Die Präparation der rekombinanten Bacmid-DNA erfolgte nach den Herstellerangaben des verwendeten BAC-TO-BAC® Baculovirus-Expressionssystem. Die Rekombination wurde mit einer PCR mittels bacmidspezifischen Oligonukleotiden untersucht. Positive Bacmid-DNAs wurden zur Transfektion von Insektenzellen verwendet. Diese generieren aus dem Bacmid infektiöse Baculoviren, die dann wie unter 3.3.3.5 beschrieben weiter vermehrt werden.

3.3.3.1 Klonierung in den Transfervektor pFASTBAC-1

Um die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase und die NOsGC Fusionskonstrukte $\beta_1\alpha_1$ und $\beta_1\alpha_2$ im Insektenzellsystem zu exprimieren, musste die DNA aus ihrem Ursprungsvektor pEYFP-N1 in den

pFASTBAC-1 Vektor umklont werden. Sowohl der Ursprungsvektor pEYFP-N1 mit den NOsGC Fusionskonstrukten und β_1 YFP, als auch der pFASTBAC-1 Vektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und SpeI verdaut. Mittels anschließender Ligation wurde die DNA von den NOsGC Fusionskonstrukten $\beta_1\alpha_1$ und $\beta_1\alpha_2$ und β_1 YFP in den pFASTBAC-1 Vektor inseriert. Die fluoreszenzmarkierte Untereinheit α_1 YFP wurde mit den Restriktionsendonukleasen NheI und XbaI aus dem Vektor pEYFP-N1 isoliert und in den XbaI und SpeI geschnittenen Vektor pFASTBAC-1 ligiert. Die fluoreszenzmarkierte Untereinheit α_2 YFP wurde mit den Restriktionsendonukleasen Eco47III und NotI aus dem Vektor pEYFP-N1 isoliert und in den StuI und NotI geschnittenen Vektor pFASTBAC-1 mittels Ligation eingefügt.

3.3.3.2 Transposition in DH10BAC *E.coli*-Zellen

Für die Transposition wurden die chemisch kompetenten DH10Bac *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und etwa 1 μ g des entsprechenden pFASTBAC-Konstruktes mit 100 μ l Zellsuspension vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 sec bei 42 °C wurden die Zellen 2 min auf Eis gekühlt. Danach wurde der Transpositionsansatz mit 900 μ l LB-Medium versetzt und für 4 h bei 37 °C und 800 rpm im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l auf LB-Agarplatten ausplattiert, die 50 μ g/ml Kanamycin, 7 μ g/ml Gentamycin, 10 μ g/ml Tetracyclin, 150 μ g/ml Bluo-gal und 40 μ g/ml IPTG enthalten. Nach 24-48 h Inkubation bei 37 °C können weiße von blauen Kolonien unterschieden werden, weiße Kolonien enthalten hierbei das rekombinante Bacmid. Zur Isolierung von rekombinanter Bacmid-DNA wurden große, weiße Kolonien von den entsprechenden Platten ausgewählt und in 5 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin, 7 μ g/ml Gentamycin, 10 μ g/ml Tetracyclin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Präparation der Bacmid-DNA erfolgte wie die Präparation von Plasmid-DNA (unter 3.2.5 beschrieben) und wurde im Anschluss einer PCR-Kontrolle mit bacmidspezifischen Oligonukleotiden unterzogen.

3.3.3.3 Kultivierung von Sf9-Zellen

Sf9-Insekten-Zellen stammen aus Ovarien von *Spodoptera frugiperda* (Familie Noctuidae, Ordnung Lepidoptera). Diese Zelllinie wurde 1983 von Gale E. Smith [160-161] aus der Linie IPLB-Sf21 AE weiterentwickelt und ist besonders anfällig für das AcMNPV-Virus.

Sf9-Zellen wurden sowohl adhärent (Monolayer) als auch in Suspension im Brutschrank bei 27 °C ohne CO₂-Begasung kultiviert. Für die Kultivierung wurde, wenn nicht anders erwähnt, das serumfreie Medium Sf-900II SFM mit 1 % Penicillin / Streptomycin verwendet. Dem Medium wurde vor seiner Verwendung noch fetales Rinderserum in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugesetzt. Im weiteren Verlauf wird dieses Medium als Gebrauchsmedium bezeichnet. Die adhärent wachsenden Sf9-Zellen wurden jeden zweiten Tag abhängig von der Zelldichte im Verhältnis 1:2 bis 1:4 umgesetzt. Dazu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. Die Zellen wurden anschließend durch Klopfen abgelöst, resuspendiert und neu ausgesät. Sf9-Zellen in Suspension wurden mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in einer Schüttelkultur bei 140 rpm gestartet und durch regelmäßiges Verdünnen mit frischem Medium bis zu einer Zelldichte von $3,5 \times 10^6$ Zellen/ml gehalten. Sf9-Zellen verdoppelten sich unter optimalen Umständen etwa alle 18-24 Stunden.

3.3.3.4 Transfektion der Sf9-Zellen

Zur Transfektion wurden zunächst 1×10^6 Sf9-Zellen in jede Vertiefung einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen ausgesät und anschließend bei 27 °C inkubiert. Nach Anwachsen der Zellen (etwa nach einer Stunde) wurde das Gebrauchsmedium gegen antibiotika- und serumfreies Sf-900II SFM Medium ausgetauscht. Für die Transfektion von Zellen einer Vertiefung einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen wurden 2 µg der entsprechenden positiven Bacmid-DNA in 100 µl Sf-900II SFM Medium und 8 µl Cellfectin[®] Reagenz in 100 µl Sf-900II SFM Medium vorbereitet. Anschließend wurden beide Lösungen miteinander vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Transfektionsmischung mit 800 µl Sf-900II SFM Medium versetzt, vorsichtig gemischt und auf die Zellen gegeben. Nach einer 5-stündigen Inkubation bei 27 °C wurde die Transfektionsmischung abgenommen und 2 ml frisches Gebrauchsmedium auf die Zellen gegeben. Der Überstand wurde nach 5-tägiger Kultivierung für die Amplifikation von Viren verwendet.

3.3.3.5 Amplifikation der isolierten Baculoviren

Zur Amplifikation von Baculoviren wurden 100-500 ml einer Suspensionskultur von Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ mit virushaltigem Überstand aus der Transfektion oder vorhergehenden Amplifikation versetzt. Die Kultur wurde 5-8 Tage bei 27°C geschüttelt bis die Vitalität der Kultur bei etwa 40 % lag. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert ($4000 \times g$, 10 min) und der virushaltige Überstand vor Licht geschützt bei 4°C gelagert.

3.3.3.6 Titerbestimmung der Baculoviren nach der Endpunktverdünnungsmethode

Bei der Endpunktverdünnungsmethode wird die Verdünnung der Viruslösung ermittelt, die 50 % der Kultur infiziert [162]. Dieser TCID_{50} -Wert wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{PD} = (A-50) / (A-B)$$

$$\text{Log TCID}_{50} = V(A) - \text{PD}$$

PD = proportionale Distanz des 50%-Signals zum Signal bei Verdünnung A

V(A) = Exponent der Virusverdünnung A

A = Prozentsatz der infizierten Vertiefungen der Virusverdünnung mit einer Infektiösität über 50%

B = Prozentsatz der infizierten Vertiefungen der Virusverdünnung mit einer Infektiösität unter 50%

$$\text{TCID}_{50} = 10^{\text{Log TCID}_{50}}$$

Daraus berechnet sich dann der spezifische Titer des Virusüberstandes nach folgender Formel:

$$\text{pfu} / \text{ml} = (1 / \text{TCID}_{50}) \times 0,69 \times \text{Faktor}$$

pfu = plaque forming unit

Faktor = entsprechend dem Volumen der eingesetzten Virusverdünnung um auf 1 ml zu kommen

Dazu werden je 100 μl Sf9-Zellsuspension (5×10^4 Zellen/ml) auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und mit 10 μl virushaltiger Lösung in verschiedenen Verdünnungen (10^{-2} bis 10^{-9}) versetzt. Die Zellen einer Reihe der Mikrotiterplatte werden mit je einer Verdünnung infiziert. Als Kontrolle dienen nicht infizierte Sf9-Zellen. Nach 5-7 Tagen kann durch das Auszählen der Mikrotiterplatte der Grad der Infektiösität ermittelt werden. Infizierte und uninfizierte Vertiefungen

einer Virusverdünnung werden unter dem Mikroskop ausgezählt und daraus diejenige theoretische Verdünnung berechnet, bei der 50 % der Zellen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte infiziert waren (TCID₅₀). Eine ausführliche Erläuterung der Methode mit den statistischen Grundlagen findet sich bei Dougherty [163] und Hughes und Wood [164].

Infizierte Sf9-Zellen erkennt man an cytopathischen Effekten, wie z.B. einem vergrößerten Zellkern. Die infizierten Zellen haften außerdem nicht mehr richtig am Boden sondern liegen in Suspension vor. Der Virustiter eines amplifizierten Virusüberstandes sollte zwischen 10⁻⁸ und 10⁻⁹ liegen. Aus dieser Angabe kann mittels der nachfolgenden Gleichung die Menge an Virusüberstand für die Infektion, berechnet werden:

$$\text{benötigtes Inoculum (ml)} = \frac{\text{gewünscht MOI (pfu/Zelle)} \times \text{Gesamtzellzahl}}{\text{Titer des Virus (pfu/ml)}}$$

3.3.4 Infektion der Sf9-Zellen zur Herstellung der rekombinanten Proteine

Das für die Infektion von Sf9-Zellen geeignete Verhältnis von Viren (pfu) zu Zellen wird MOI („multiplicity of infection“) genannt und hat als Einheit pfu/Zelle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Zellen in der Regel mit MOI-Werten von 0,5-4 infiziert. Für die Infektion von Sf9-Zellen im präparativen Maßstab wurden diese in Schüttelkultur vermehrt. In 100 ml Erlenmeyer-Kolben wurden 2 x 10⁶ Sf9-Zellen/ml in einem Volumen von 20 ml mit dem für die gewünschte MOI benötigten Volumen an Virus-Lösung versetzt und 74 Stunden bei 27 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit bis zu zwei verschiedenen rekombinanten Viren angeimpft, welche für Guanylyl-Cyclase Untereinheiten kodieren.

3.3.5 Gewinnung des rekombinanten Proteins aus den infizierten Sf9-Zellen

Die infizierte Sf9-Zellsuspension wurde in 50 ml Röhrchen überführt und sedimentiert (4 °C, 4000 x g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml TEA Lysispuffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 4-mal mit 4 sec mit 50 % maximaler Leistung im Sonoplus Ultraschall-

Homogenisator unter Eiskühlung aufgeschlossen. Die Zellkerne, Membranen und restlichen Zellbestandteile wurden für 30 min bei 4 °C und 21000 x g abgetrennt und die cytosolische Fraktion in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Roti[®]Quant von der Firma Roth nach Herstellerangaben. Das Prinzip dieses Assays beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm nach Bindung des Proteins an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau, wobei die Zunahme der Absorption proportional zur Proteinkonzentration ist [165]. Als Standardprotein wurden definierte Lösungen von Rinderserumalbumin (BSA) genutzt.

3.3.7 Bestimmung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität

Die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde nach der Methode von Schultz und Böhme bestimmt [166]. Die Messung beruht auf der Bestimmung von [³²P]cGMP, das aus [α -³²P]GTP gebildet wurde.

Homogenat, Cytosol bzw. Enzymfraktionen wurden in Anwesenheit von 0,025 mg Kreatin-Kinase, 50 mM TEA/HCl (pH 7,4), 1 mM IBMX, 3 mM MgCl₂, 5 mM Kreatinphosphat, 1 mM cGMP, 0,5 mM GTP und [α -³²P]GTP in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l für 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Anwesenheit von zusätzlichem cGMP verringerte sich zum einen der Anteil an abgebautem [³²P]cGMP durch eventuell vorhandene Phosphodiesterasen und erhöhte sich zum anderen die Wiederfindungsrate von [³²P]cGMP. Sollte die Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter stimulierten Bedingungen gemessen werden, wurden zu dem Inkubationsansatz unterschiedliche Konzentrationen des NO-Donors DEA/NO und/oder Modulatoren der Guanylyl-Cyclase zugegeben (siehe 1.3). Die Reaktion wurde nach 10 min durch die Zugabe von 500 μ l 120 mM Zinkacetat gestoppt. Durch die Zugabe von 500 μ l 120 mM Natriumcarbonat wurden die 5'-Nukleotide mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitiert [167]. Durch Zentrifugation für 8 min bei 21000 x g wurde das Präzipitat sedimentiert. Das im Überstand verbleibende [³²P]cGMP wurde an saurem Aluminiumoxid aufgereinigt [168]. Dazu wurde Aluminiumoxid in Chromatographie-Tropfsäulen mit 2 ml 0,1 M

Perchlorsäure angesäuert und noch während der Ansäuerung wurden 900 µl vom Überstand der Inkubationsansätze aufgetragen. Die Säulen wurden zweimal mit 5 ml demineralisiertem Wasser gespült und anschließend das [³²P]cGMP mit 5 ml 250 mM Natriumacetat (pH 6,5) in Szintillationsgefäße eluiert. Die Zerfallsrate des ³²P wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Zur Berechnung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität ist die Bestimmung des Leerwertes notwendig, der durch einen Ansatz ohne Protein in der Versuchsreihe ermittelt wurde. Die Zählrate von nicht enzymatisch entstandenem [³²P]cGMP [169] wurde so ermittelt und konnte im Anschluss von den Zählraten der Proben abgezogen werden. Während der Probenaufbereitung wird ein Teil des cGMP mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitiert bzw. nicht vollständig von den Aluminiumoxidsäulen eluiert. Zur quantitativen Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde in einigen Ansätzen [³²P]cGMP anstatt [α-³²P]GTP eingesetzt. Die Wiederfindungsrate wurde dann aus dem Verhältnis von isolierter zu eingesetzter Radioaktivität errechnet und lag bei 0,5 ± 0,05. Die Reinheit des [α-³²P]GTP lag bei 0,9. Die spezifische Aktivität der Guanylyl-Cyclase wird angegeben, als die Menge cGMP (in nmol), die von 1 mg Protein in 1 min gebildet wird. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$v = \frac{(C - C_0)}{C_t} \times \frac{S}{W \times RG \times P \times t}$$

| | |
|----------------|--|
| v | spez. Aktivität der Guanylyl-Cyclase (nmol cGMP x min ⁻¹ x mg Protein ⁻¹) |
| C | Zählrate der Probe (cpm) |
| C ₀ | Zählrate des Leerwertes (cpm) |
| C _t | Zählrate des eingesetzten [α- ³² P]GTP (cpm) |
| S | Menge des eingesetzten Substrates 5'-GTP pro Ansatz (nmol) |
| W | Wiederfindungsrate von cGMP (bestimmt mit [³² P]cGMP, um Verluste durch Kopräzipitation mit ZnCO ₃ oder unvollständige Elution von der Säule zu quantifizieren) |
| RG | Reinheitsgrad des [α- ³² P]GTP |
| P | Proteinmenge pro Inkubationsansatz (mg) |
| t | Inkubationsdauer (min) |

3.3.8 Immunpräzipitation

Als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation (IP) diente das Cytosol der verschiedenen Proben. Es wurden 1,5 mg Gesamtprotein des Sf9-Zell Cytosols oder 3 mg Gesamtprotein des Hirncytosols eingesetzt, das vorher mit 10 mg Protein A Sepharose CL-4B für 2 h in einem Über-Kopf-Schüttler bei 4 °C inkubiert wurde, um

Proteine, die unspezifisch an Protein A binden zu entfernen. Danach wurde die Matrix abzentrifugiert und der Überstand mit 5 µg von einem anti-sGC Antikörper (α_1 , α_2 oder β_1) oder anti-GFP Antikörper über Nacht unter den gleichen Bedingungen geschüttelt. Im Anschluss wurde der Antigen-Antikörper-Komplex über das Fc-Fragment des Antikörpers mit Protein A Sepharose CL-4B gefällt. Dazu wurden 20 mg Protein A Sepharose CL-4B zu dem mit dem Antikörper inkubierten Überstand gegeben und für weitere 2 h in einem Über-Kopf-Schüttler bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Matrix abzentrifugiert, dreimal mit IP-Lysispuffer und einmal mit IP-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 40 µl IP-Probenpuffer dazugegeben und für 3 min bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden anschließend mit 1 µl 0,1 % Bromphenolblau versetzt und sofort auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

3.3.9 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte gemäß ihrer Molekularmasse nach der Laemmli Methode [170]. Hierzu wurden 50 µg Gesamtprotein vom Sf9-Zell Cytosol, 90 µg Gesamtprotein von den Hirnhomogenaten und Hirncytosol und 1 µg angereinigtes Protein in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die anschließende Elektrophorese erfolgte vertikal in einem 5 %igem Sammelgel und 8 %igem Trenngel bei 80-100 V.

3.3.10 Sensitive Coomassie Färbung

Um die angereinigten Proteine im SDS-Gel sichtbar zu machen wurden sie mittels Coomassie Färbung angefärbt. Hierbei wurde eine spezielle, sensitive Coomassie Färbung nach Kang et al. verwendet [171]. Die SDS-Gele wurden zunächst mit Reinstwasser zweimal 10 min lang gespült, bevor die Proteine über Nacht in der Färbelösung geschwenkt und anschließend je nach Färbegrad entfärbt wurden. Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte durch Scannen oder Trocknen des Gels.

3.3.11 Western Blot Analyse

Für die Immundetektion wurden, die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit dem Semi-Dry Blotting Verfahren [172] auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es wurde eine Stromstärke von 2 mA/cm² Nitrozellulosemembran bei variabler Spannung für 60-120 min angelegt.

Nach dem Transfer wurden die Proteine mittels Ponceau S angefärbt und der Proteinstandard mit einem Kugelschreiber direkt auf der Nitrocellulosemembran markiert. Zur Entfernung der Färbelösung und zum Absättigen freier Proteinbindungsstellen auf der Membran, erfolgte eine einstündige Inkubation in Blocking-Puffer bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch. Nach einmaligem Waschen der Membran in TBST-Puffer folgte eine 90 minütige Inkubation des ersten Antikörpers in TBST-Puffer bei Raumtemperatur. Nach einer erneuten Waschphase von 3 x 10 Minuten in TBST-Puffer erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem 1:2000 verdünnten anti-Kaninchen HRP-linked Antikörper in TBST-Puffer bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 10 min in TBST-Puffer wurde die Membran mit Hilfe des „Lumi-Light^{Plus} Western-Blot Substrat“ nach Herstellerangabe und der ChemiLuxTM ECL Dokumentationsanlage entwickelt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm MCID AnalysisTM.

3.4 Anreinigung rekombinanter Proteine aus Sf9-Zellen mittels Chromatographie

Alle Chromatographie-Schritte wurden mit einem Äkta Purifier-System der Firma GE Healthcare durchgeführt. Die Beladung, das Waschen und die Elution wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm und 430 nm kontrolliert.

3.4.1 Herstellung der cytosolischen Fraktion

Für die Anreinigung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase wurden Sf9-Zellen in großem Maßstab in Schüttelkultur vermehrt. Insgesamt wurden 500 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 2×10^6 Sf9-Zellen/ml mit dem, für die gewünschte MOI benötigten Volumen an Virus-Lösung versetzt und 74 Stunden bei 27 °C inkubiert. Die Zellen wurden in 50 ml Röhrchen überführt und sedimentiert (4 °C, 4000 x g, 2 min). Die Überstände wurden verworfen und die Zellen in 30 ml TEA Lysispuffer pH 7,4 resuspendiert und mit 300 µl einer 25 µM Avidinlösung versetzt. Die Zellen wurden viermal 16 sec lang mit 50 % maximaler Leistung im Sonoplus Ultraschall-Homogenisator unter Eiskühlung aufgeschlossen. Diese Suspension wurde danach 30 min bei 4 °C Überkopf schüttelnd inkubiert, bevor die Zellkerne, Membranen und restlichen Zellbestandteile für 1 h bei 4 °C und 15000 x g

abgetrennt wurden. Die cytosolische Fraktion wurde im Anschluss mit einem Membranfilter von 0,45 µm und von 0,2 µm Porengröße filtriert.

3.4.2 Affinitätschromatographie mittels Strep-Tactin

Die meisten Proteine besitzen die Fähigkeit, reversible nicht-kovalente Bindungen mit anderen Molekülen einzugehen. Auf diesem Prinzip basiert die Affinitätschromatographie zur Reinigung von Proteinen. Bei dieser Technik wird ein Ligand an einer inerten und porösen Matrix immobilisiert. Wird eine ungereinigte Proteinlösung auf die Affinitätsmatrix aufgetragen, bindet das gewünschte Protein, wogegen andere Substanzen mit dem Puffer von der Säule gewaschen werden. Das gesuchte Protein wird anschließend unter geeigneten Bedingungen von der Affinitätsmatrix eluiert.

Die Affinitätschromatographie der rekombinant exprimierten NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase erfolgte über den Affinitätstag STREPTag II, ein Oktapeptid (WSHPQFEK) mit intrinsischer Bindungsaffinität gegenüber Streptavidin [173-175]. Da die Dissoziationskonstante (K_d) des STREPTag II zu Streptavidin $>10^{-5}$ M ist, wurde von Voss und Skerra [176] Strep-Tactin, eine Streptavidinvariante mit höherer STREPTag II Bindungsaffinität (K_d ca. 10^{-6} M), generiert. Proteine, die mit einem STREPTag II versehen sind, lassen sich häufig quantitativ und ohne größeren Aktivitätsverlust mit Hilfe von Strep-Tactin-Sepharose aufreinigen [177]. Die Affinitätschromatographie wurde mit 4 ml Strep-Tactin® Superflow® high capacity in einer C 10/10 Säule mit dem Adapter AC 10 der Firma GE Healthcare durchgeführt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Säule mit zehn Säulenvolumina Strep-Waschpuffer äquilibriert. Cytosolisches Protein wurde auf die äquilibrierte Strep-Tactin®-Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit fünf Säulenvolumina Strep-Waschpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte mit fünf Säulenvolumina Strep-Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min. Das Elutionsvolumen wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Alle Fraktionen, die eine Absorption bei 430 nm zeigten, wurden vereinigt und auf Guanylyl-Cyclase-Aktivität hin untersucht.

Im Anschluss erfolgte die Regeneration der Strep-Tactin®-Säule mit 15 Säulenvolumina Strep-Regenerationspuffer und acht Säulenvolumina Strep-Waschpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min.

3.4.3 Umpuffern mittels Gelfiltrationschromatographie

Zum Entsalzen der vereinigten Fraktionen des ersten Chromatographie-Schritts wurde die Gelfiltrationssäule HiPrep 26/10 Desalting der Firma GE Healthcare verwendet. Das Prinzip der Gelfiltration beruht darauf, dass native, globuläre Proteine aufgrund ihrer Zusammensetzung (Homomer, Dimer etc.) eine unterschiedliche Größe aufweisen. In der Gelfiltrationsmatrix wandern größere Proteine schneller, da sie schlechter mit den Poren der Matrix interagieren können als kleinere Proteine, so dass hierdurch eine Trennung von nativen Proteinen unterschiedlicher Größe erreicht wird.

Vor Gebrauch wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen IEX-1 Puffer äquilibriert. Die im ersten Chromatographie-Schritt vereinigten Fraktionen wurden unmittelbar auf die Gelfiltrationssäule mit einer Flussrate von 15 ml/min aufgetragen und mit zwei Säulenvolumen eluiert. Aufgrund der Säulencharakteristika wurde lediglich IEX-1 Puffer verwendet. Im Anschluss an die Chromatographie wurden die Elutionsfraktionen (1 ml), die eine Absorption bei 430 nm zeigten, vereinigt.

3.4.4 Anionenaustauschchromatographie

Das Prinzip der Anionenaustauschchromatographie ist die unterschiedlich starke, reversible Bindung von Proteinen, die bei pH-Werten oberhalb ihres pI-Wertes negativ geladen sind. An einer polymeren Matrix befinden sich positiv geladene quaternäre Ammonium-Gruppen, die Anionen reversibel binden. Diese Bindung wird durch kompetitives Verdrängen der Proteine durch Anionen anorganischer Salze aufgehoben. Die Anionenaustausch-Chromatographie wurde mit einer Mono Q 5/50 GL Säule der Firma GE Healthcare durchgeführt.

Als Puffersystem wurden IEX-1 und IEX-2 verwendet. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Säule mit zehn Säulenvolumina IEX-1 Puffer äquilibriert. Die vereinten Fraktionen der Entsalzung wurden auf die äquilibrierte Mono Q 5/50 GL Säule mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit zehn Säulenvolumina IEX-1 Puffer bei einer Flussrate von 2 ml/min gewaschen, bis sich die Absorption nicht mehr veränderte. Die Elution erfolgte mit IEX-2 Puffer mittels eines linearen Gradienten, wobei die NaCl-Konzentration über ein Volumen von zehn

Säulenvolumina auf 1 M gesteigert wurde. Das Elutionsvolumen wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Alle Fraktionen, die eine Absorption bei 430 nm zeigten, wurden vereinigt und auf Guanylyl-Cyclase-Aktivität hin untersucht.

3.4.5 Centricon-Verfahren

Die vereinigten Fraktionen, in denen Guanylyl-Cyclase-Aktivität zu messen war, wurden nachfolgend aufkonzentriert. Dazu wurde das Centricon-Verfahrens (Millipore) genutzt. Hierzu wurde die Guanylyl-Cyclase Lösung mittels Zentrifugation ($14000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) durch eine Cellulosemembran filtriert, bis ein Endvolumen von etwa 400 μl erreicht war. Aufgrund der Porengröße der Membran, die nur einen Membrandurchgang von Proteinen mit einer molekularen Masse von weniger als 30 kDa erlaubt, wurde so der Guanylyl-Cyclase Enzymkomplex aufkonzentriert, da dieser eine deutlich höhere Molekülmasse aufweist.

3.4.6 Untersuchung des angereinigten Proteins

Das Konzentrat wurde direkt nach dem Centricon-Verfahren für eine photometrische Untersuchung eingesetzt. Hierbei wurde die Absorption der Protein-Lösung unter verschiedenen Versuchsbedingungen über einen Wellenlängenbereich von 350-550 nm detektiert. Nach der Messung wurde ein Teil des Konzentrates auf eine Konzentration von 0,5 ng/ μl verdünnt, mit 0,05 % BSA und 10 % Glycerin versetzt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für spätere Untersuchungen eingefroren.

3.4.7 Analytische Gelfiltrationschromatographie

Das Prinzip der Gelfiltration ist unter 3.4.3 beschrieben und dient der Größenbestimmung von Proteinen. Die analytische Gelfiltrationschromatographie wurde mit einer HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 (prep grade) Säule der Firma GE Healthcare durchgeführt. Durch Vergleich der gemessenen Retentionszeiten, der zu untersuchenden Proben mit den Retentionszeiten von Standardproteinen bekannter Größe konnte die Molekularmasse bestimmt werden.

Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Säule mit drei Säulenvolumina Gelfiltrationspuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,3 ml/min äquilibriert. Es

wurden 200 µg angereinigtes Protein über eine 500 µl Probenschleife mit gleicher Geschwindigkeit auf die Säule injiziert und anschließend mit 1,5 Säulenvolumina Gelfiltrationspuffer eluiert. Anhand des jeweiligen Elutionschromatogramms wurde bei den Fraktionen, die eine Absorption bei 430 nm zeigten, die Retentionszeit bestimmt und daraus die Molekularmasse errechnet. Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Fraktionen mittels Western Blot analysiert.

3.5 Statistische Auswertung

Alle Messdaten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von n unabhängigen Experimenten angegeben. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Daten wurde der Student t-Test verwendet. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen an endogener NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase im zentralen Nervensystem

Die Entwicklung von Gehirn und Nervensystem beginnt in der frühen fetalen und embryonalen Entwicklung und geht nach der Geburt weiter bis zur Pubertät. Die Ontogenese des Gehirns ist gekennzeichnet durch Zellproliferation, -migration, -differenzierung und durch die Bildung von Synapsen [178]. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass der NO / cGMP Signalweg eine wichtige Rolle bei der neuronalen Zelldifferenzierung und während der Entwicklung des zentralen Nervensystems spielt [179-181]. Über die Regulation und Expression der NO-sensitiven Guanylyl Cyclase im Gehirn während der Entwicklung ist wenig bekannt.

In vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression und Enzymaktivität der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase während der Gehirnentwicklung untersucht [148]. Dazu wurden Homogenate von Gehirnen von neonatalen (1-5 Tage alt) und adulten (90-120 Tage alt) Wistarratten analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war überraschend. Während es bei der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns zu einer signifikanten Zunahme der NO-stimulierten Enzymaktivität kam, wurde im Großhirn eine unerwartete signifikante Abnahme der NO-stimulierten Enzymaktivität der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase ermittelt. Diese verminderte Enzymaktivität im Großhirn von adulten Ratten korrelierte erstaunlicherweise nicht mit der Expression der Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. Die Expression der β_1 - und α_1 -Untereinheit blieb während der postnatalen Entwicklung des Großhirns gleich, die der α_2 -Untereinheit nahm signifikant zu. Die gleichzeitige, paradoxe Abnahme der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Großhirn adulter Ratten, war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

4.1.1 Subzelluläre Lokalisation im Kleinhirn und Großhirn

Da die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase nicht nur cytosolisch sondern auch membranassoziiert vorkommen kann, wurde untersucht, ob die Abnahme der Enzymaktivität in erster Linie in der Cytosol- oder in der Membranfraktion auftritt.

Dazu wurden diese beiden Fraktionen aus Großhirn neonataler und adulter Ratten analysiert.

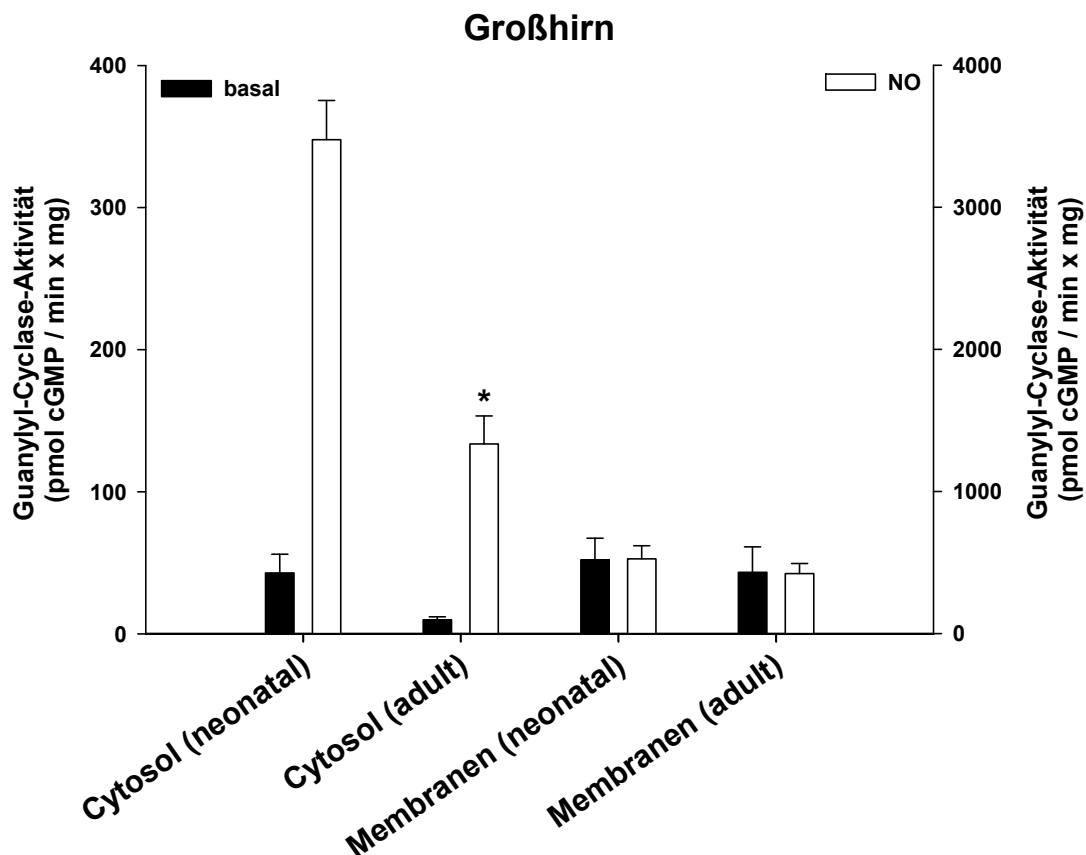


Abbildung 5: Vergleich der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Cytosol- und Membranfraktion vom Großhirn neonataler und adulter Ratten

Die Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen) und in der Gegenwart von 100 µM DEA/NO (weiße Säulen) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 6$, * $p < 0,05$ neonatal vs. adult Großhirn Cytosol).

Die Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der spezifischen Guanylyl-Cyclase Aktivitätsbestimmung in den Cytosol- und Membranfraktionen aus dem Großhirn neonataler und adulter Ratten. Unter basalen Bedingungen konnte eine spezifische Enzymaktivität in allen Proben nachgewiesen werden. In der Cytosolfraktion zeigte sich eine leichte Abnahme der Enzymaktivität während der Entwicklung, die aber keine statistische Signifikanz erreichte. In den Membranfraktionen wurde kein Unterschied in der basalen Enzymaktivität festgestellt. In Anwesenheit des NO-Donors DEA/NO (100 µM) konnte die gleiche signifikante Reduktion um etwa das Dreifache der Enzymaktivität ($2,9 \pm 0,7$ -fache) in den Cytosolfractionen während der postnatalen Entwicklung des Großhirns detektiert werden, die auch in den Homogenaten beobachtet wurde.

In den Membranfraktionen konnten keine Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien des Großhirns ermittelt werden. Darüber hinaus zeigte sich in den Membranfraktionen eine Stimulierung durch NO festgestellt werden.

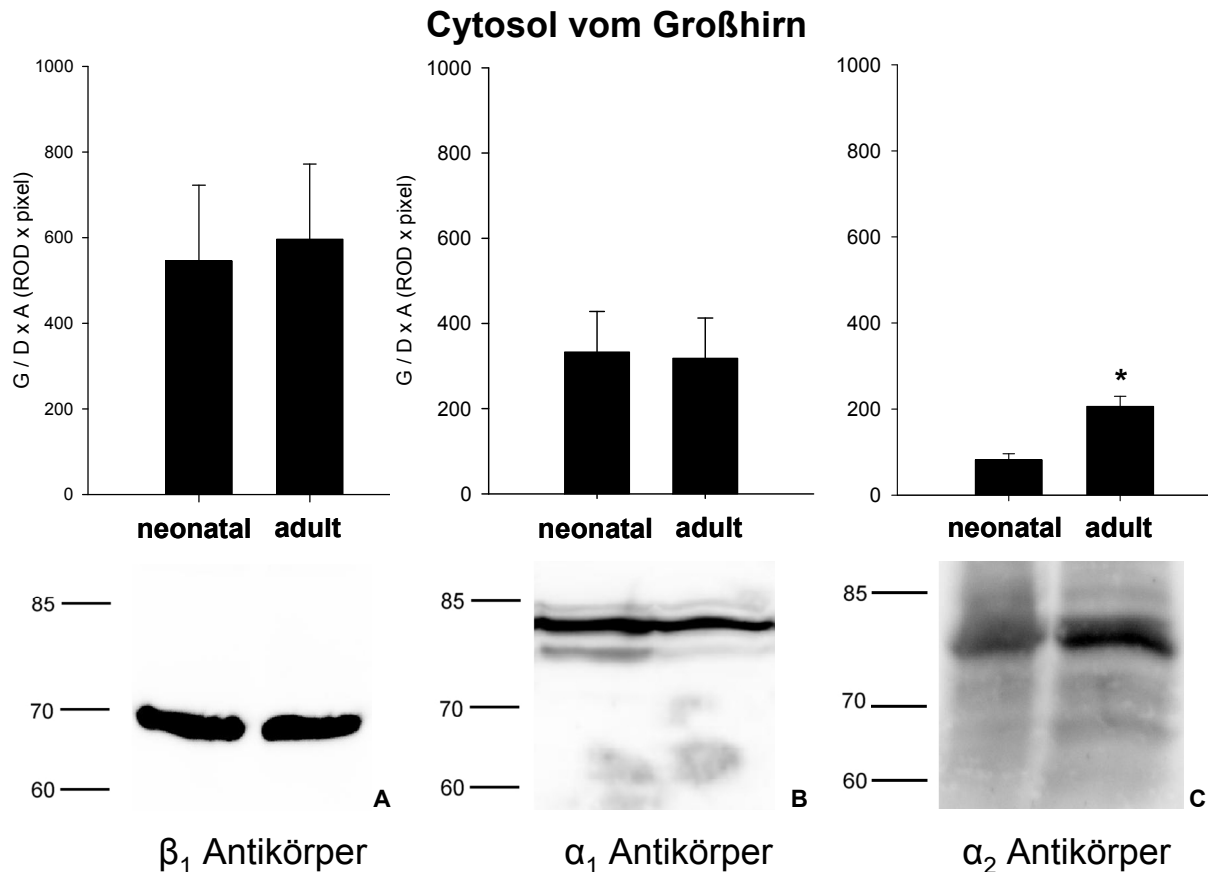


Abbildung 6: Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten im Cytosol vom Großhirn neonataler und adulter Ratten

Für die Western-Blot-Analyse wurden Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit (A), die α_1 -Untereinheit (B) und die α_2 -Untereinheit (C) eingesetzt. Alle Spuren wurden mit 90 μ g Protein des entsprechenden Homogenates beladen. Im oberen Bereich sind die Daten der densitometrischen Analyse als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 5$, * $p < 0,05$ neonatal Großhirn vs. adult Großhirn).

Die Expression der verschiedenen Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in der Cytosolfraction vom Großhirn wurde mittels Western Blot Analyse untersucht (Abb. 6). Mit spezifischen Antikörpern gegen die β_1 -, α_1 - und α_2 -Untereinheit, konnten Banden, entsprechend dem Molekulargewicht der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten (70 kDa für β_1 , 79 kDa für α_1 und 82 kDa für α_2) in dem Cytosol detektiert werden. Die Expression der Untereinheiten im Cytosol vom Großhirn neonataler und adulter Ratten zeigte ähnliche Ergebnisse an Homogenaten: Die densitometrische Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied

für die Expression der β_1 - und α_1 -Untereinheit in neonatalen und adulten Tieren. Die detektierten Signale für die Expression der α_2 -Untereinheit waren dagegen im Großhirn von adulten Ratten im Vergleich zu neonatalen signifikant erhöht. Der Verlust der Enzymaktivität in den Homogenaten aus Großhirn von adulten Tieren trotz stabiler oder erhöhter Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten wurde also in analoger Form auch in den cytosolischen Fraktionen gefunden.

4.1.2 Bestimmung der Hämkonzentration im Rattenhirn

Das Fehlen oder Vorhandensein der prosthetischen Hämgruppe in der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase hat einen dramatischen Einfluss auf die NO-stimulierte Aktivität des Enzyms. Änderungen in der Hämkonzentration während der Entwicklung des Gehirns könnten einen Einfluss auf die vorhandenen Hämoproteine haben und so der Grund für den Verlust der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Großhirn von adulten Tieren sein.

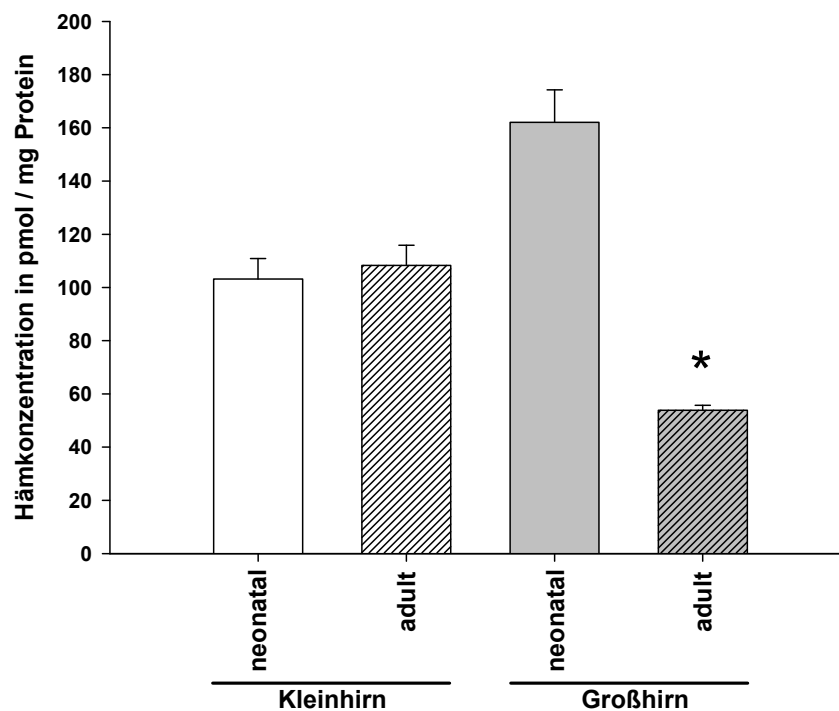


Abbildung 7: Hämkonzentration im Kleinhirn und Großhirn von neonatalen und adulten Ratten

Die Bestimmung der Hämkonzentration wurde in mehreren unabhängigen Versuchen durchgeführt (n = 15). Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt (*p < 0.05 neonatal vs. adult Großhirn)

Die Messung der Hämkonzentration im Homogenat aus Kleinhirn und Großhirn von neonatalen und adulten Ratten zeigte einen signifikanten Unterschied während der Entwicklung des Großhirns (Abb. 7). Im Großhirn von adulten Ratten war die Hämkonzentration um das Dreifache verringert ($3,0 \pm 0,2$ -fache). Im Kleinhirn konnte kein Unterschied in der Hämkonzentration zwischen neonatalen und adulten Ratten festgestellt werden.

4.1.3 Einfluss von hämunabhängigen Guanylyl-Cyclase-Aktivatoren auf die Enzymaktivität

Als nächstes überprüften wir die Hypothese, ob die geringe Hämkonzentration im Großhirn von adulten Tieren einen Einfluss auf die Hämhaltigkeit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase hat. Die Bestimmung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde in Anwesenheit des Hämvorläufers Protoporphyrin IX (PPIX) und der hämunabhängigen Guanylyl-Cyclase-Aktivatoren Ataciguat (HMR 1766) und Cinaciguat (BAY 58-2667) durchgeführt (Abb. 8).

Unter basalen Bedingungen wurde eine leichte Abnahme der spezifischen Enzymaktivität im Großhirn der adulten Tiere im Vergleich zu den neonatalen beobachtet, die aber keine statistische Signifikanz erreichte. Im Kleinhirn neonataler und adulter Ratten wurde kein Unterschied in der basalen Enzymaktivität festgestellt. In Anwesenheit des Hämvorläufers Protoporphyrin IX ($100 \mu\text{M}$) kam es zu keinen signifikanten Unterschieden in der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität: Es zeigte sich eine nicht signifikante Zunahme der Enzymaktivität im Kleinhirn von adulten Ratten. Im Großhirn von adulten Ratten kam es dagegen zu einer nicht signifikanten Abnahme der Enzymaktivität. Unter dem Einfluss von $10 \mu\text{M}$ Ataciguat zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der spezifischen Enzymaktivität: Auch hier kam es zu einer tendenziellen Zunahme der Aktivität im Kleinhirn und zu einer nicht signifikanten Abnahme der Aktivität im Großhirn während der Entwicklung.

In Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Cinaciguat beobachteten wir eine signifikante Abnahme der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Großhirn von adulten Tieren. Im Kleinhirn wurde ein Anstieg in der Enzymaktivität während der Entwicklung festgestellt, die aber keine statistische Signifikanz erreichte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die drastische Abnahme der spezifischen Guanylyl-Cyclase-

Aktivität im Großhirn von adulten Tieren nicht auf einen Verlust der prosthetischen Hämgruppe der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zurückzuführen ist.

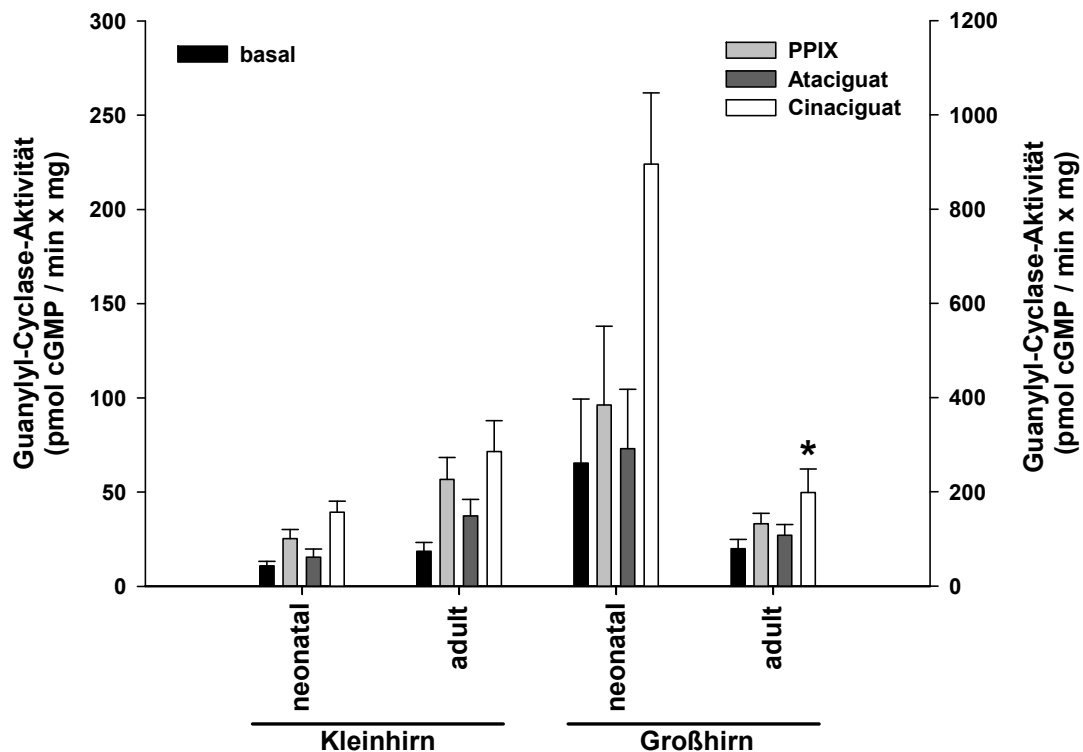


Abbildung 8: Vergleich der hämunabhängigen spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Kleinhirn und Großhirn von neonatalen und adulten Ratten

Die Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen) und in der Gegenwart von 100 μ M PPIX (graue Säulen), 10 μ M Ataciguat (dunkelgraue Säulen) sowie 10 μ M Cinaciguat (weiße Säulen) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 3$, * $p < 0,05$ neonatal Großhirn vs. adult Großhirn)

4.1.4 Untersuchungen zur Heterodimerisierung

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase ist nur als Heterodimer aktiv, das aus einer α und einer β_1 -Untereinheit besteht. Eine sehr einfache Erklärung für die Diskrepanz zwischen der Expression der Untereinheiten und der spezifischen Enzymaktivität wäre eine Ansammlung von einzelnen NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten, die keine Heterodimere bilden. Um diese Hypothese zu prüfen, haben wir Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt.

4.1.4.1 Heterodimerisierung im Großhirn

Für die Untersuchung der Heterodimerisierung wurde das Cytosol aus dem Großhirn neonataler und adulter Ratten mit einem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit der

NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase inkubiert, präzipitiert und im Anschluss mittels Western Blot analysiert.

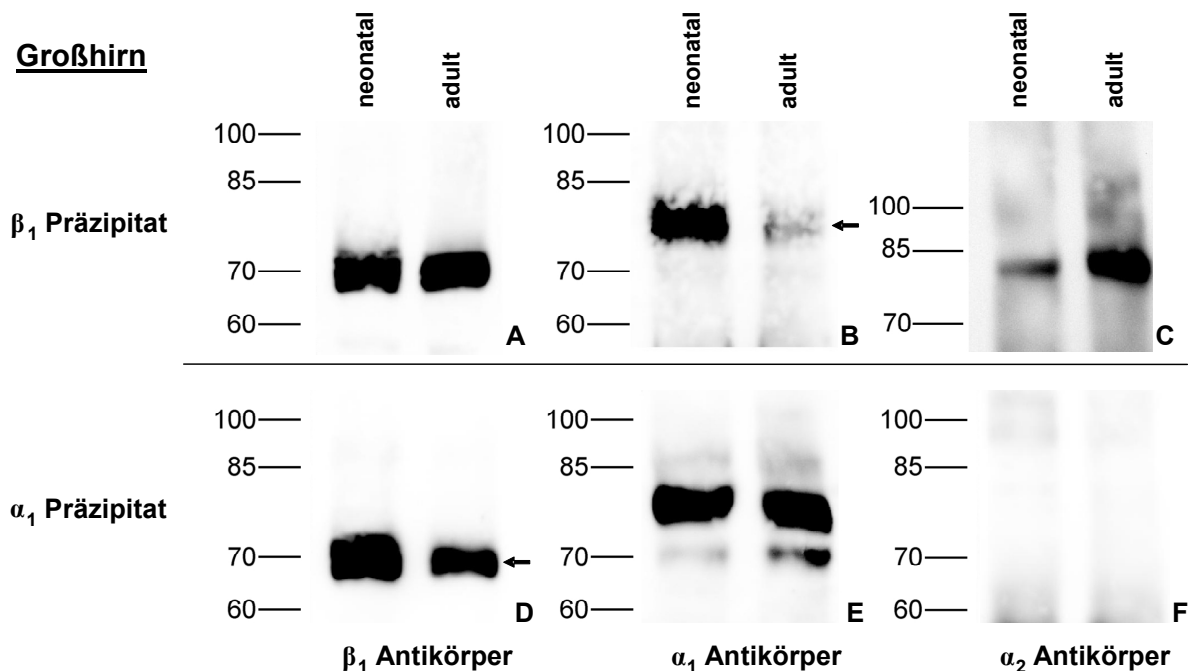


Abbildung 9: Western Blot Analyse der β_1 und α_1 Immunpräzipitate aus Cytosolen vom Großhirn neonataler und adulter Ratten

Die Präzipitate wurden untersucht mit spezifischen Antikörpern gegen die β_1 - (A, D), α_1 - (B, E) und α_2 - (C, F) Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase.

Im β_1 Präzipitat konnten die β_1 -, α_1 - und α_2 -Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 9 A-C). Im Großhirn adulter Tiere wurde signifikant weniger von der α_1 -Untereinheit im Präzipitat detektiert als im Großhirn von neonatalen Tieren (Abb. 9 B Pfeil, Abb. 10 B). Im Gegensatz dazu war das detektierte Signal für die α_2 -Untereinheit signifikant stärker im Großhirn von adulten Tieren im Vergleich zu neonatalen (Abb. 9 C, Abb. 10 C). Um sicherzustellen, dass mit dem β_1 Antikörper die gleiche Menge aus den Cytosolen vom Großhirn präzipitiert wurde, wurde die β_1 -Untereinheit mittels Western Blot detektiert (Abb. 9 A). Die detektierten Signale zeigten keinen Unterschied für die β_1 -Untereinheit (Abb. 10 A).

Vergleicht man die Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten im Cytosol (siehe 4.1.1) mit den Ergebnissen der Immunpräzipitation zeigt sich, dass ein erheblicher Teil der α_1 -Untereinheit nicht mit der β_1 -Untereinheit heterodimerisiert.

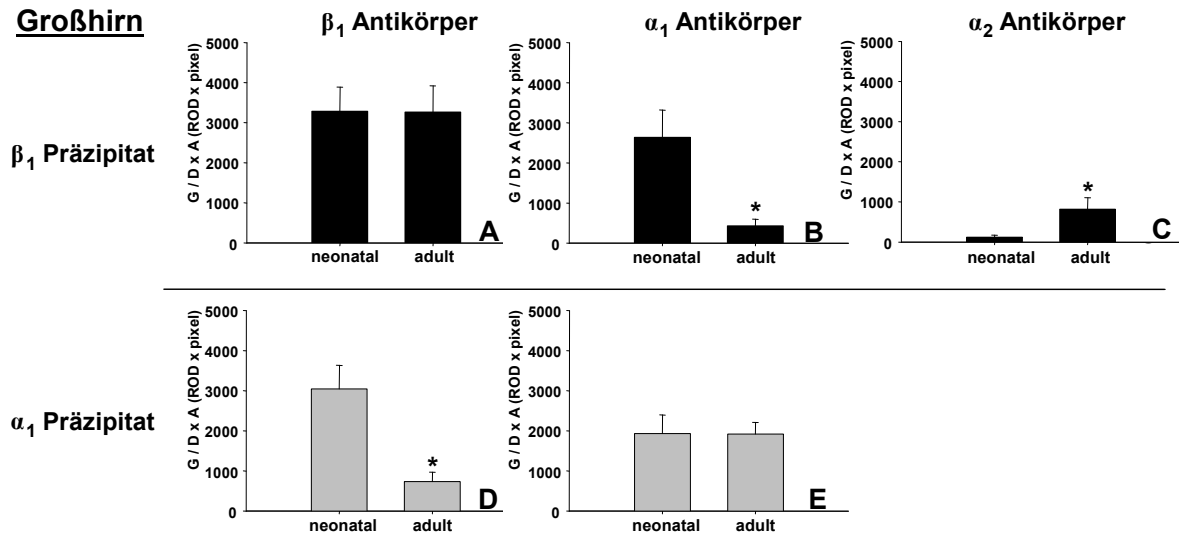


Abbildung 10: Densitometrische Analyse der präzipitierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten aus dem Großhirn

Die Daten der Densitometrie sind analog zu den repräsentativen Western Blots in Abb. 9 für die β_1 - (A, D), α_1 - (B, E) und α_2 - (C) Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase und werden als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 5$, * $p < 0,05$).

Um die verminderte Assoziation zwischen der β_1 - und α_1 -Untereinheit im Großhirn von adulten Tieren zu bestätigen, führten wir Immunpräzipitationsexperimente mit einem Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit durch (Abb. 9 D-F). Im α_1 Präzipitat konnten die β_1 - und α_1 -Untereinheit mittels Western Blot Analyse detektiert werden. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen fehlenden Dimerisierung der α_1 - und α_2 -Untereinheit, konnte wie zu erwarten keine α_2 -Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 9 F). Im Großhirn adulter Tiere konnte signifikant weniger von der β_1 -Untereinheit im Präzipitat detektiert werden als in neonatalen Tieren (Abb. 9 D Pfeil, Abb. 10 D). Um sicherzustellen, dass mit dem α_1 Antikörper die gleiche Menge aus den Cytosolen vom Großhirn präzipitiert wurde, wurde die α_1 -Untereinheit mittels Western Blot detektiert (Abb. 9 E). Die detektierten Signale für die α_1 -Untereinheit zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Entwicklungsstadien (Abb. 10 E).

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation mit dem β_1 und α_1 Antikörper stehen miteinander im Einklang und sprechen dafür, dass es im Großhirn zu einer verminderten Heterodimerisierung der β_1 - und α_1 -Untereinheit während der Entwicklung kommt.

4.1.4.2 Heterodimerisierung im Kleinhirn

Für die Untersuchung der Heterodimerisierung im Kleinhirn wurde das Cytosol von neonatalen und adulten Ratten mit einem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit und α_1 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase inkubiert, präzipitiert und im Anschluss mittels Western Blot analysiert.

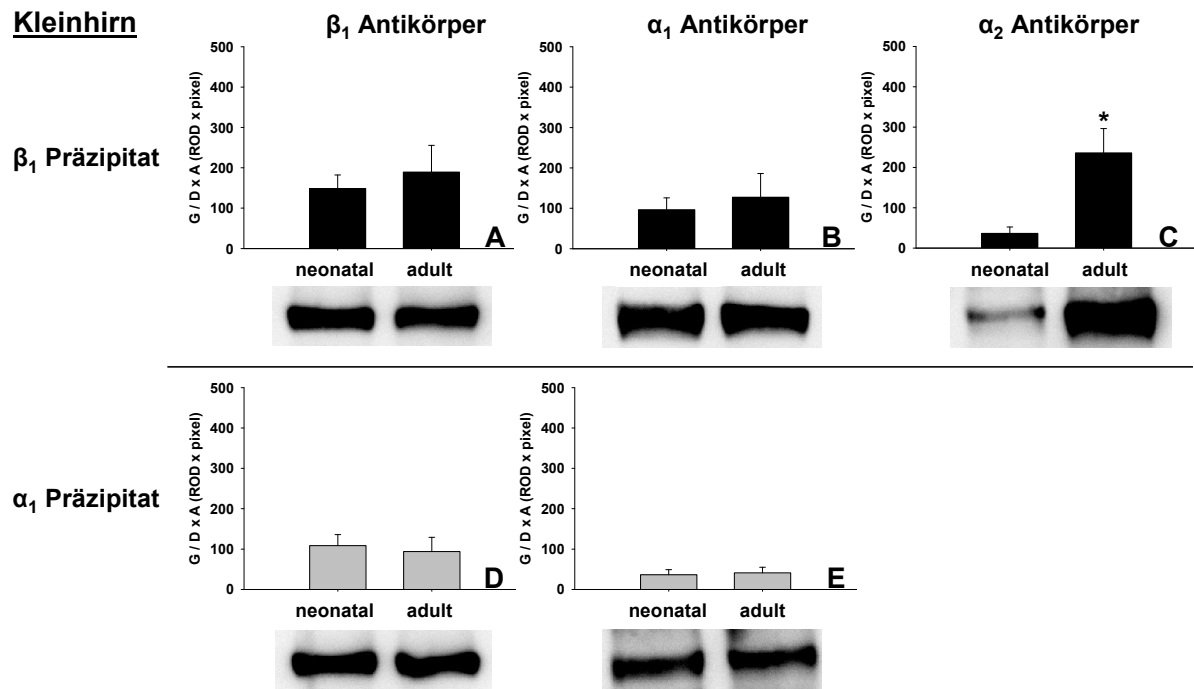


Abbildung 11: Densitometrie und Western Blot Analyse der präzipitierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten aus dem Kleinhirn

Die Präzipitate wurden untersucht mit spezifischen Antikörpern gegen die β_1 - (A, D), α_1 - (B, E) und α_2 - (C, F) Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. Die Daten der Densitometrie werden als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 3$, * $p < 0,05$).

Die Abbildung 11 zeigt die Immunpräzipitationsanalyse für das Kleinhirn neonataler und adulter Ratten. Im β_1 Präzipitat konnten die β_1 -, α_1 - und α_2 -Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 11 A-C). Um sicherzustellen, dass mit dem β_1 Antikörper die gleiche Menge aus den Cytosolen vom Kleinhirn präzipitiert wurde, erfolgte der Nachweis der β_1 -Untereinheit mittels Western Blot (Abb. 11 A). Die detektierten Signale für die β_1 - (Abb. 11 A) und α_1 -Untereinheit (Abb. 11 B) zeigten keinen signifikanten Unterschied. Das detektierte Signal für die α_2 -Untereinheit war im Kleinhirn adulter Tiere signifikant stärker als im Kleinhirn neonataler Tiere (Abb. 11 C).

Im α_1 Präzipitat konnten die β_1 - und α_1 -Untereinheit mittels Western Blot Analyse detektiert werden (Abb. 11 D und F). Im Kleinhirn konnten keine signifikanten Unterschiede für die β_1 -Untereinheit und α_1 -Untereinheit zwischen den Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Die Detektion der α_1 -Untereinheit erfolgte, um sicherzustellen, dass mit dem α_1 Antikörper die gleiche Menge der α_1 -Untereinheit aus den Kleinhirn Cytosolen präzipitiert wurde.

4.1.5 Zusammenfassung der Daten zu den Untersuchungen an endogener NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase im zentralen Nervensystem

Wir beobachteten einen Verlust der Enzymaktivität im Großhirn, trotz stabiler beziehungsweise erhöhter Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten während der postnatalen Entwicklung. Bei weiteren Untersuchungen dieser Diskrepanz zwischen Enzymaktivität und Expression zeigte sich, dass es zu einer fehlenden Heterodimerisierung der Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase kam. Unsere Daten zeigen, dass das Ausmaß der Heterodimerisierung der Untereinheiten die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Großhirn der Ratte während der Entwicklung beeinflusst.

4.2 Untersuchungen an der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im rekombinanten System

Wir konnten zeigen, dass im Großhirn nicht heterodimerisierende NO-sensitive Guanylyl-Cyclase Untereinheiten existieren. Zabel et. al. haben gezeigt, dass sowohl die β_1 - als auch die α_1 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in der Lage ist, inaktive Homodimere zu bilden [149]. Nach ihren Ergebnissen führt die Überexpression von Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im rekombinanten System immer zu einer Mischung von inaktiven Homodimeren und aktiven Heterodimeren. Sie stellten basierend auf Überexpressionsexperimenten die Hypothese auf, dass die Regulierung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität auch über eine Änderung des Verhältnisses zwischen Heterodimeren und Homodimeren stattfinden könnte. Diese Hypothese blieb lange Zeit unbeachtet, erhält aber durch die unter 4.1 geschilderten *in vivo* Befunde neue Aktualität und Unterstützung.

4.2.1 Die Homodimerisierung der Untereinheiten

Die rekombinante Expression einer funktionellen NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase mit dem Baculovirus-Expressionssystem erfordert die Koexpression beider Untereinheiten. In Sf9-Zellen, die gleichzeitig mit Viren für die β_1 - und α_1 -Untereinheit infiziert wurden, bildeten die NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten neben Heterodimeren auch Homodimere [149]. Um diese Ergebnisse in unserem System zu reproduzieren, haben wir Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Für die Untersuchung der Homodimerisierung haben wir die Untereinheiten mit einem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) markiert. YFP hat ein Molekulargewicht von 27 kDa. Somit lassen sich die YFP-markierten Untereinheiten gut von den unmarkierten Untereinheiten im Western Blot unterscheiden. Sf9-Zellen wurden gleichzeitig mit Viren für eine markierte und unmarkierte Untereinheit (β_1/β_1 YFP, α_1/α_1 YFP und α_2/α_2 YFP) infiziert. Das aus diesen Zellen aufgearbeitete Cytosol wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen YFP inkubiert, präzipitiert und im Anschluss mittels Western Blot analysiert.

In den Präzipitaten (β_1/β_1 YFP, α_1/α_1 YFP und α_2/α_2 YFP) der verschiedenen Untereinheiten, konnten die entsprechenden markierten und unmarkierten

Untereinheiten mit spezifischen Antikörpern gegen die β_1 -, α_1 - und α_2 -Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 12 A-C). Mit dem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit, konnte im präzipitierten β_1/β_1 YFP Sf9 Cytosol eine Bande bei ~ 70 kDa für die β_1 -Untereinheit und eine Bande bei ~ 100 kDa für β_1 YFP detektiert werden (Abb. 12 A). Der Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit zeigte im präzipitierten α_1/α_1 YFP Sf9 Cytosol ein Signal bei ~ 80 kDa für die α_1 -Untereinheit und bei ~ 110 kDa für α_1 YFP (Abb. 12 B). Mit Hilfe des Antikörpers gegen die α_2 -Untereinheit konnte eine ~ 80 kDa Bande für die α_2 -Untereinheit und eine ~ 110 kDa Bande für α_2 YFP nachgewiesen werden (Abb. 12 C).

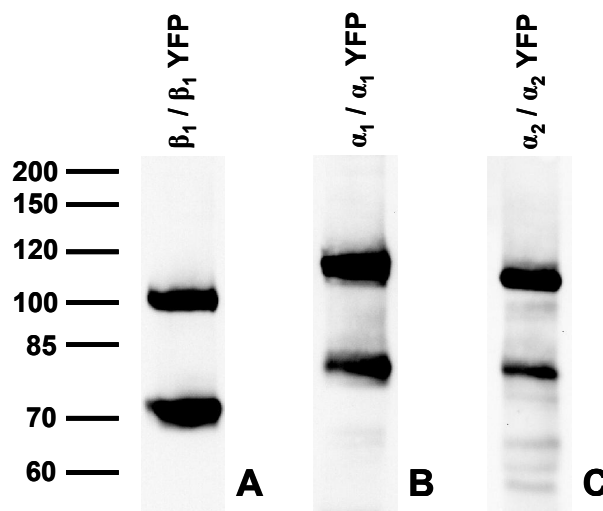


Abbildung 12: Homodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten

Die Cytosole von Sf9-Zellen, die die YFP markierte und unmarkierte Untereinheit koexprimieren, wurden für die Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen YFP verwendet. Die Präzipitate wurden mit spezifischen Antikörpern gegen β_1 - (A), α_1 - (B) und α_2 -Untereinheit (C) mittels Western Blot analysiert.

Die Immunpräzipitationsexperimente zeigten für unser System, dass β_1 und α_1 die Fähigkeit haben Homodimere zu bilden. Darüber hinaus ergaben unsere Daten, dass auch die α_2 -Untereinheit zur Homodimerisierung fähig ist. In Übereinstimmung mit Zabel et al. zeigen die vorliegenden Daten, dass die rekombinante Koexpression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase immer zu einer Mischung von aktiven Heterodimeren und inaktiven Homodimeren führt, die eine Untersuchung am isolierten rein heterodimer aufgebauten Enzymkomplex unmöglich macht [149].

4.2.2 Expression der NOsGC Fusionskonstrukte

Für Untersuchungen an reinem Heterodimer haben wir Fusionkonstrukte der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NOsGC Fusionkonstrukte) kloniert, die eine 1:1-Stöchiometrie zwischen den α -Untereinheiten und der β_1 -Untereinheit garantieren und die mögliche Bildung von Homodimeren ausschließen (Abb. 13). Untersuchungen basierend auf Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer haben gezeigt, dass der Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit und der Aminotermus der α -Untereinheiten in enger räumlicher Nähe liegen (Entfernung 10-100 Å) [182]. Basierend auf diesen Daten haben wir den Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit direkt mit dem Aminotermus der α -Untereinheiten fusioniert. Dabei entstand ein Linker von einer Aminosäure beim $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt und von 53 Aminosäuren beim $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstrukt (Abb. 13).

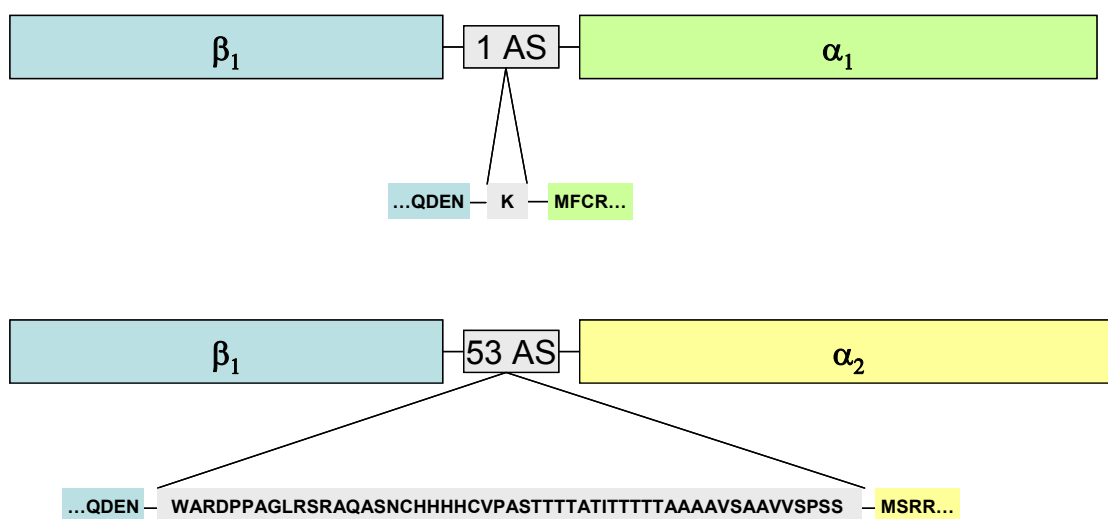


Abbildung 13: Schematische Darstellung der NOsGC Fusionskonstrukte

Der Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit (blau) wurde direkt mit dem Aminotermus der α_1 - (grün) oder α_2 - (gelb) Untereinheit, fusioniert. Zwischen den Untereinheiten entstand ein Linker (grau), mit einer Länge von einer Aminosäure (AS) beim $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt und 53 Aminosäuren beim $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstrukt.

Die Expression der NOsGC Fusionskonstrukte im Baculovirus/Sf9-System wurde mittels Western Blot untersucht (Abb. 14 und 15). Als Negativ Kontrolle wurde Cytosol aus nicht infizierten Sf9-Zellen verwendet. Für die Detektion des $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstruktes aus Cytosol von Sf9-Zellen wurden Antikörper gegen die β_1 - und α_1 -Untereinheit im Western Blot eingesetzt (Abb. 14). Mit dem Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit, konnte ein Signal bei dem erwarteten Molekulargewicht von 70 kDa für die β_1 -Untereinheit des α_1/β_1 Heterodimers und ein Signal bei dem erwarteten Molekulargewicht von 150 kDa für das $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt im Sf9 Cytosol

detektiert werden. Der Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit erkannte ebenfalls eine Bande bei 150 kDa für das $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt und eine Bande bei 80 kDa für die α_1 -Untereinheit des α_1/β_1 Heterodimers.

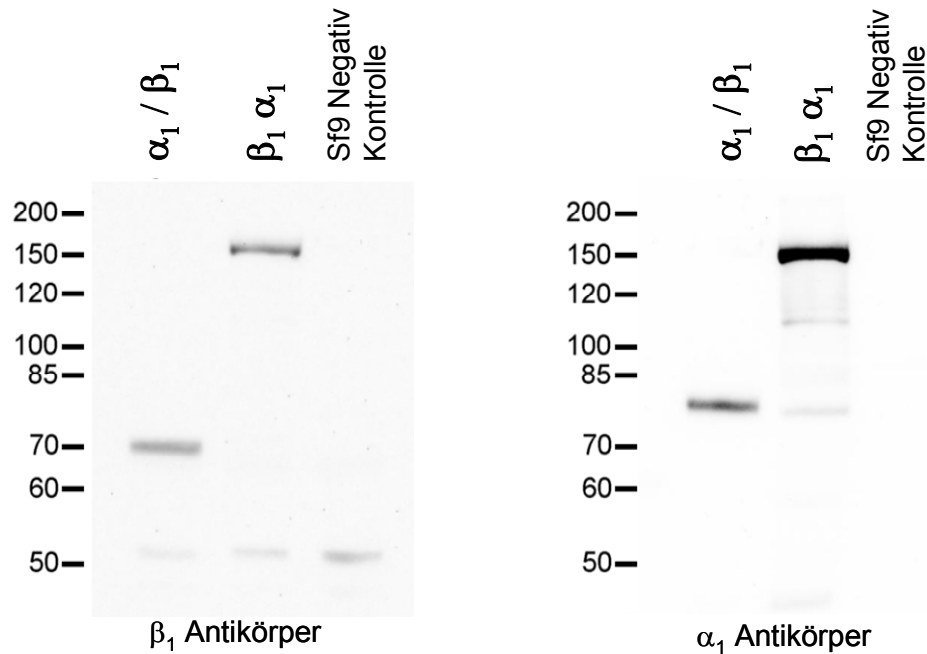


Abbildung 14: Charakterisierung der Expression des $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstruktes in Sf9-Zellen

Für die Western-Blot-Analyse wurden Antikörper gegen die β_1 - und α_1 -Untereinheit eingesetzt. Alle Spuren wurden mit 50 μ g Protein des entsprechenden Cytosols beladen. Als Negativ Kontrolle wurde das Cytosol von uninfizierten Sf9-Zellen verwendet.

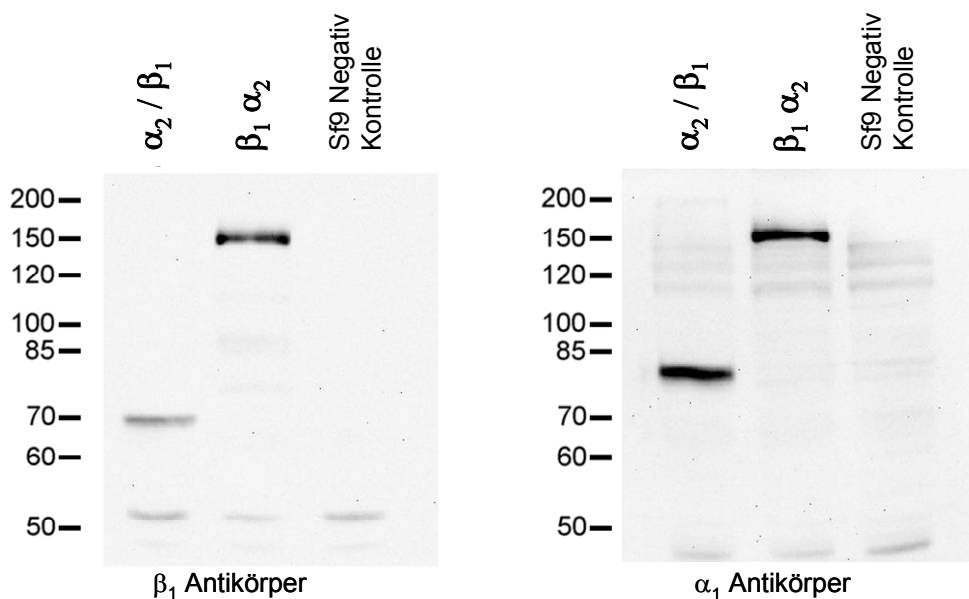


Abbildung 15: Charakterisierung der Expression des $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstruktes in Sf9-Zellen

Für die Western-Blot-Analyse wurden Antikörper gegen die β_1 - und α_2 -Untereinheit eingesetzt. Alle Spuren wurden mit 50 μ g Protein des entsprechenden Cytosols beladen. Als Negativ Kontrolle wurde das Cytosol von uninfizierten Sf9-Zellen verwendet.

Für die Detektion des $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstruktes im Cytosol von Sf9-Zellen wurden Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit und gegen die α_2 -Untereinheit im Western-Blot eingesetzt (Abb. 15). Der Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit, erkannte eine Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht von 70 kDa für die β_1 -Untereinheit des α_2/β_1 Heterodimers und eine Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht von 150 kDa für das $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstrukt in Sf9 Cytosol. Mit dem Antikörper gegen die α_2 -Untereinheit konnte ein Signal bei 150 kDa für das $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstrukt und eine Bande bei 82 kDa für die α_2 -Untereinheit des α_2/β_1 Heterodimers detektiert werden.

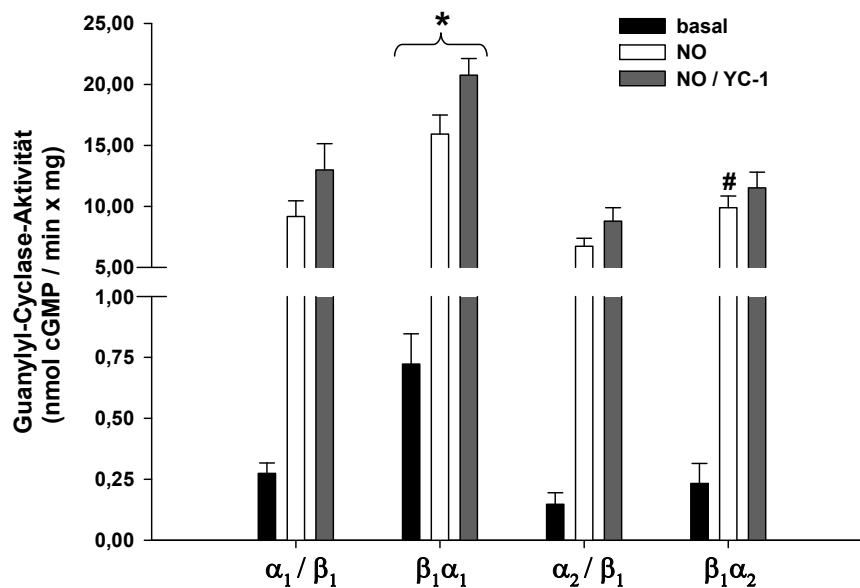


Abbildung 16: Vergleich der spezifischen Enzymaktivität in cytosolischen Fraktionen von Sf9-Zellen, die die β_1 - und α -Untereinheit koexprimieren oder die NOsGC Fusionskonstrukte exprimieren

Die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen), in der Gegenwart von 100 μ M DEA/NO (weiße Säulen) und in der gleichzeitigen Gegenwart von 100 μ M DEA/NO und 100 μ M YC-1 (graue Säulen) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 4$, * $p < 0,05$ α_1/β_1 vs. $\beta_1\alpha_1$).

Die Expression der NOsGC Fusionskonstrukte in Sf9-Zellen führte zu funktionellen, NO-sensitiven Enzymkomplexen. Die Guanylyl-Cyclase-Aktivität der jeweiligen cytosolischen Fraktionen von infizierten Sf9-Zellen, die die β_1 - und α -Untereinheit koexprimieren, sowie die NOsGC Fusionskonstrukte, wurden unter verschiedenen Bedingungen untersucht (Abb. 16). Unter basalen Bedingungen konnte eine spezifische Enzymaktivität in allen Proben nachgewiesen werden. In Gegenwart von 100 μ M DEA/NO konnte erwartungsgemäß die basale Enzymaktivität für die koexprimierten Heterodimere und die NOsGC Fusionskonstrukte gesteigert werden. Durch die zusätzliche Anwesenheit von 100 μ M YC-1 erfolgte erwartungsgemäß eine

weitere Erhöhung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität. Es war eine Tendenz zu höherer spezifischer Enzymaktivität für die NOsGC Fusionskonstrukte gegenüber den Heterodimeren unter allen experimentellen Bedingungen erkennbar, die aber nicht unter allen Bedingungen statistische Signifikanz erreichte. Das $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt zeigte eine signifikant höhere Aktivität unter allen Bedingungen im Vergleich zum α_1/β_1 Heterodimer. Beim $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstrukt konnte nur unter NO-stimulierten Bedingungen eine signifikant höhere Enzymaktivität im Vergleich zum α_2/β_1 Heterodimer nachgewiesen werden.

4.2.3 Untersuchungen an angereinigten NOsGC Fusionskonstrukten

Zur Charakterisierung der NOsGC Fusionskonstrukte, reinigten wir diese und die koexprimierten Heterodimere über eine Affinitätschromatographie mittels STREptag II (S) an [175]. Zur weiteren Anreinigung erfolgte im Anschluss eine Anionenaustauschchromatographie.

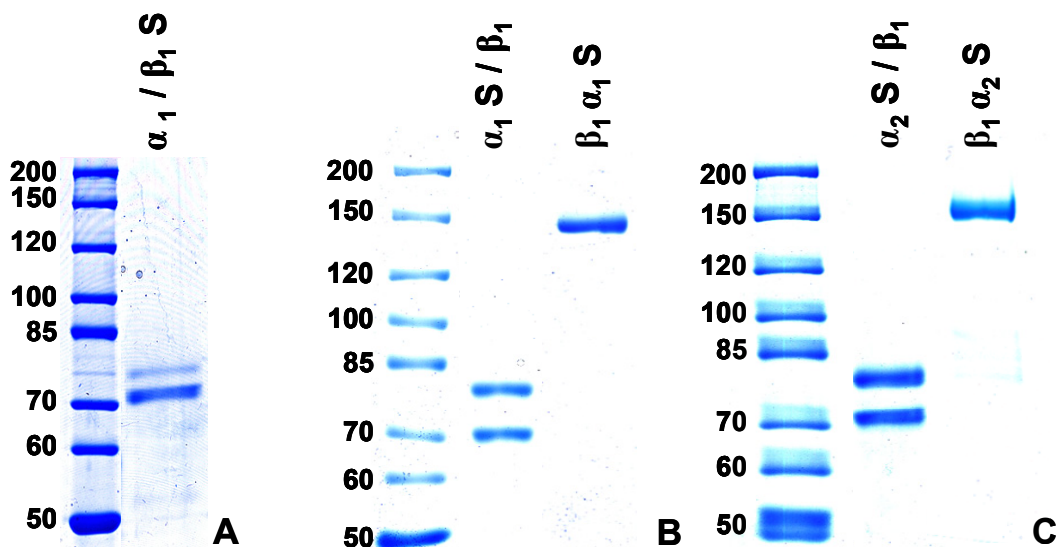


Abbildung 17: SDS-PAGE Analyse der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte

Von den angereinigten Enzymen (S steht für den STREptag II) wurde jeweils 1 µg elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassie Färbung sichtbar gemacht.

Abbildung 17 zeigt die Coomassie gefärbten SDS Polyacrylamidgelen der angereinigten koexprimierten Isoformen und NOsGC Fusionskonstrukte. Die beiden detektierten Banden für die koexprimierten Heterodimere mit einem Molekulargewicht von ~ 80 kDa und ~ 70 kDa entsprechen dem erwarteten Molekulargewicht aufgrund der Aminosäuresequenz (80 kDa für α_1 S, 79 kDa für α_1 ,

84 kDa für α_2S , 71 kDa für β_1S und 70 kDa für β_1). Für die NOsGC Fusionskonstrukte konnte ein Signal mit einem Molekulargewicht von ~ 150 kDa detektiert werden, das dem geschätzten Molekulargewicht des $\beta_1\alpha_1S$ und $\beta_1\alpha_2S$ Fusionskonstruktes von 149 kDa und 159 kDa entsprach.

Durch eine Affinitätschromatographie der koexprimierten Heterodimere mit einem STREptag II am Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit wurde ein ungleiches Verhältnis der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten mit einer Verschiebung zur β_1 -Untereinheit erhalten (Abb. 17 A). Dies lässt auf eine Anreicherung von β_1 Homodimeren schließen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse haben wir den Carboxyterminus der α -Untereinheiten mit einem STREptag II versehen, was zu einem gleichen Verhältnis der Untereinheiten bei den koexprimierten Enzymisofomen führte (Abb. 17 B und C).

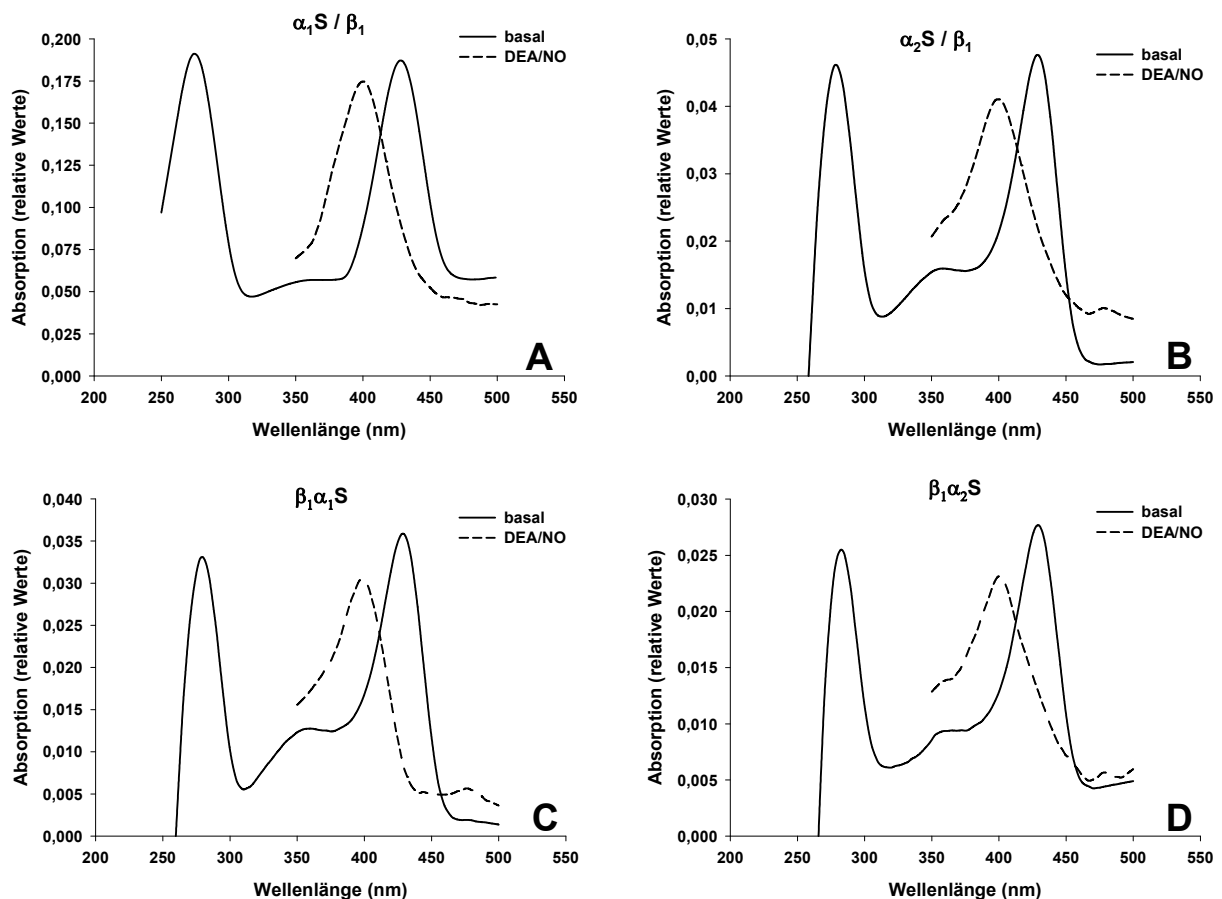


Abbildung 18. Die Absorptionsspektren der angereinigten Guanylyl-Cyclase Enzymkomplexe

Die spektroskopische Analyse zeigt die relativen Absorptionswerte unter basalen (durchgezogene Linie) und NO-stimulierten (100 μ M DEA/NO, gestrichelte Linie) Bedingungen. Das Verhältnis der Absorption von 430 nm und 280 nm war $0,81 \pm 0,13$ für α_1S/β_1 (A), $0,82 \pm 0,10$ für $\beta_1\alpha_1S$ (C), $0,92 \pm 0,04$ für α_2S/β_1 (B) und $0,90 \pm 0,05$ für $\beta_1\alpha_2S$ (D) (S steht für den STREptag II).

4.2.3.1 Spektroskopische Untersuchung

Die Absorptionsspektren für die angereinigten koexprimierten Heterodimere und die NOsGC Fusionskonstrukte zeigten im Bereich zwischen 250 und 500 nm ein typisches Absorptionsmuster mit einem Maximum bei ~ 430 nm, welches als Soret-Bande bezeichnet wird (Abb. 18) [64-65, 67]. Dieses Absorptionsmaximum wird durch die prosthetische Hämgruppe hervorgerufen [67]. In Anwesenheit eines NO-Donors kommt es zu einer Verminderung des Absorptionsmaximums, einhergehend mit einer Linksverschiebung auf ~ 400 nm [67]. Die spektroskopische Analyse der gereinigten Enzyme zeigte die in der Literatur beschriebene Soret-Bande mit einem Absorptionsmaximum bei ~ 430 nm in Abwesenheit von NO (Abb. 18). In Gegenwart des NO-Donors DEA/NO (100 µM) ergab sich die typische Linksverschiebung des Absorptionsmaximums auf ~ 400 nm mit Verminderung der maximalen Absorption. Das Absorptionsverhalten der NOsGC Fusionskonstrukte (Abb. 18 C und 18 D) unterschied sich nicht von dem jeweiligen koexprimierten Heterodimer (Abb. 18 A und 18 B). Das Verhältnis der Absorption von 430 nm zu 280 nm war für alle angereinigten Enzymvarianten nicht signifikant unterschiedlich.

4.2.3.2 Analytische Gelfiltration der NOsGC Fusionskonstrukte

Es wäre vorstellbar, dass die NOsGC Fusionskonstrukte nur deshalb Enzymaktivität aufweisen, weil sie höher geordnete Komplexe ausbilden. In solchen Komplexen könnten die Untereinheiten eines Fusionskonstruktes mit der β_1 -Untereinheit eines anderen Fusionskonstruktes dimerisieren und einen aktiven Enzymkomplex bilden. Um dies auszuschließen haben wir eine analytische Gelfiltration der NOsGC Fusionskonstrukte im Vergleich mit dem jeweiligen koexprimierten Heterodimer durchgeführt. Abbildung 19 zeigt die Elutionsprofile der Gelfiltration bei der Absorption der Soret-Bande von 430 nm. Die NOsGC Fusionskonstrukte und koexprimierten Isoformen zeigen jeweils ein Maximum beim gleichen Elutionsvolumen und haben somit ein ähnliches Molekulargewicht. Die Western Blot Analyse der entsprechenden Fraktionen von der analytischen Gelchromatographie mit spezifischen Antikörpern gegen die NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten, zeigte Signale für die koexprimierten Heterodimere und die NOsGC Fusionskonstrukte entsprechend dem vorhergesagten Molekulargewicht ihrer Aminosäuresequenz (Abb. 20).

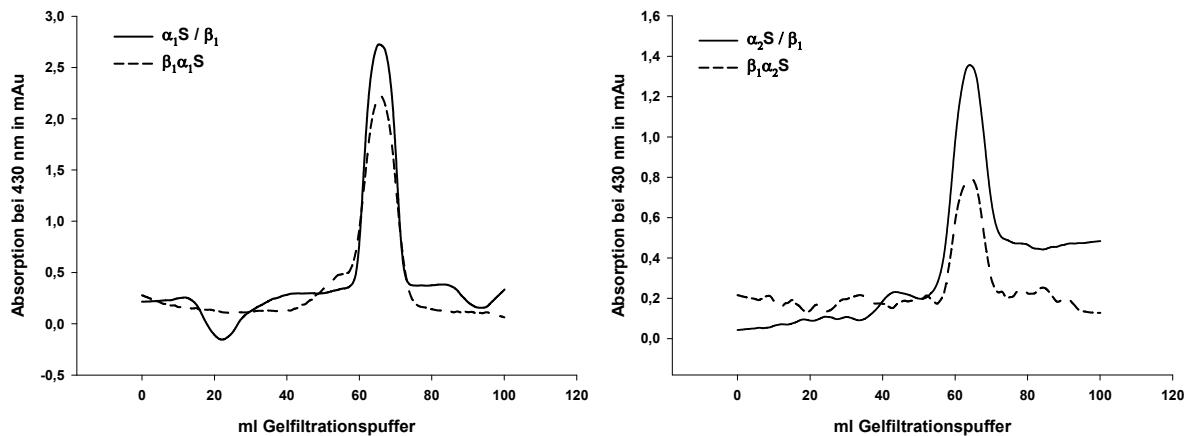


Abbildung 19: Analytische Gelfiltration der angereinigten Guanylyl-Cyclase Enzymkomplexe
Die Elutionsprofile von der Gelfiltrationssäule zeigen die Absorptionswerte bei 430 nm für die koexprimierten Heterodimere im Vergleich zu dem entsprechenden NGSF Fusionskonstrukt.

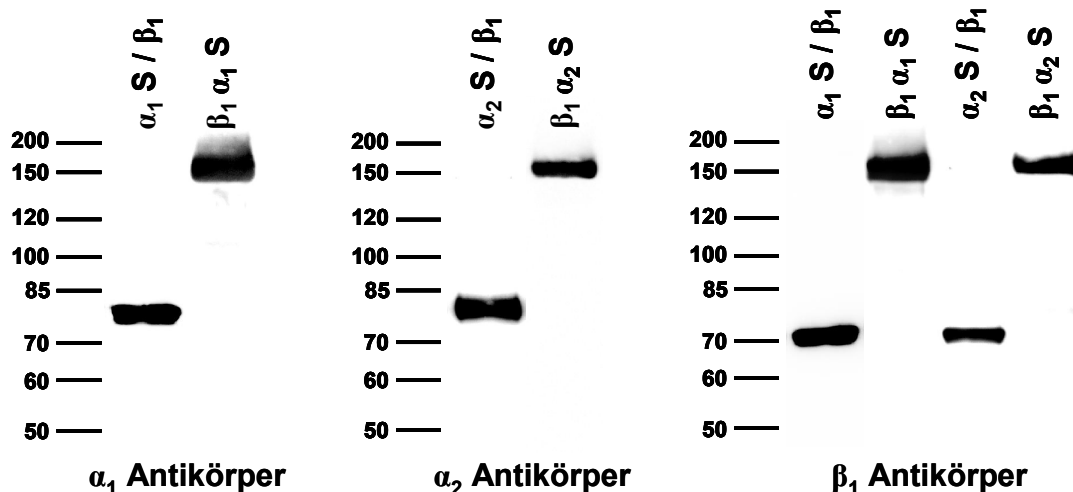


Abbildung 20: Western Blot Analyse der gepoolten Peakfraktionen der analytischen Gelfiltration

Von den aufkonzentrierten Fraktionen der Guanylyl-Cyclase Enzymkomplexe wurden je 1 µg Protein eingesetzt und mittels Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen die α₁-, α₂- und β₁-Untereinheit analysiert.

4.2.3.3 Bestimmung der Enzymaktivität

Für die weitere Charakterisierung der angereinigten NGSF Fusionskonstrukte wurde die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen im Vergleich mit den angereinigten koexprimierten Heterodimeren bestimmt (Abb. 22).

Unter basalen Bedingungen war die spezifische Enzymaktivität signifikant höher bei den NGSF Fusionskonstrukten im Vergleich zu dem jeweiligen Heterodimer. Die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität war in Anwesenheit des NO-Donors DEA/NO

(100 μ M) und zusätzlicher Anwesenheit von YC-1 (100 μ M) nicht unterschiedlich zwischen den NOsGC Fusionskonstrukten und den koexprimierten Heterodimeren. Allerdings war die Stimulation durch NO sehr gering: für α_1 S/ β_1 ~17-fach, für $\beta_1\alpha_1$ S ~ 8-fach, für α_2 S/ β_1 ~ 10-fach und für $\beta_1\alpha_2$ S ~ 6-fach.

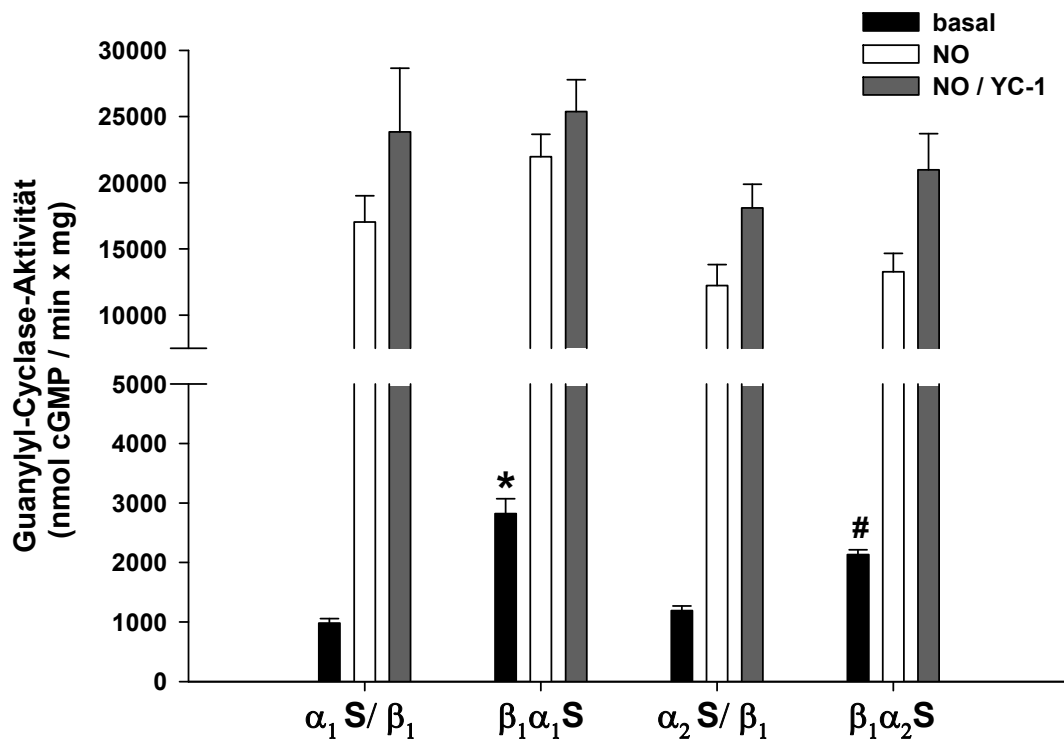


Abbildung 21: Vergleich der spezifischen Enzymaktivität der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte

Die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen), in der Gegenwart von 100 μ M DEA/NO (weiße Säulen) und gleichzeitiger Gegenwart von 100 μ M DEA/NO und 100 μ M YC-1 (graue Säulen) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 3$, * $p < 0,05$ α_1 S/ β_1 basal vs. $\beta_1\alpha_1$ S basal, # $p < 0,05$ α_2 S/ β_1 basal vs. $\beta_1\alpha_2$ S basal).

Um zu untersuchen, ob die Anreinigung über den STREptag II am Carboxyterminus der α -Untereinheit Einfluss auf die NO-Stimulierbarkeit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase hat, wurde die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität vom angereinigten α_1/β_1 S Heterodimer bestimmt, das über einen STREptag II am Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit angereinigt wurde (Abb. 22). Unter basalen Bedingungen konnte für α_1/β_1 S spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität bestimmt werden. Durch die Zugabe von 100 μ M DEA/NO kam es zu einer um das ~ 94-fache gesteigerten Aktivitätssteigerung. Bei der Anreinigung über die β_1 -Untereinheit zeigten die Enzymkomplexe einen bis zu 10-fach niedrigeren Basalwert als bei der Anreinigung über die α_1 -Untereinheit, was zu einem höheren Stimulationsfaktor durch NO führte.

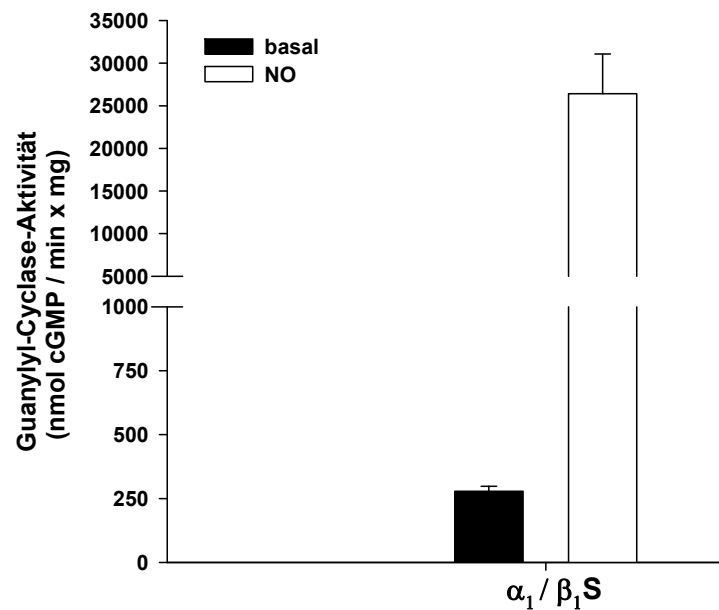


Abbildung 22: Spezifische Enzymaktivität des koexprimierten α_1/β_1S Heterodimers angereinigt über die β_1 -Untereinheit

Die Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen) und in der Gegenwart von 100 μM DEA/NO (weiße Säulen) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 3$).

4.2.3.4 Enzymkinetik der NOsGC Fusionskonstrukte

Für die weitere Charakterisierung der NOsGC Fusionskonstrukte wurde die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für die angereinigten NOsGC Fusionskonstrukte im Vergleich zu dem jeweiligen angereinigten Heterodimer untersucht. Abbildung 23 A zeigt die GTP-abhängige Enzymaktivität unter basalen Bedingungen in einem Lineweaver-Burk-Diagramm. Die daraus resultierenden K_m -Werte der NOsGC Fusionskonstrukte im Vergleich zu dem jeweiligen koexprimierten Heterodimer waren nicht signifikant unterschiedlich (K_m Werte: $99,64 \pm 8,31 \mu\text{M}$ für α_1S/β_1 Heterodimer, $95,35 \pm 11,59 \mu\text{M}$ für $\beta_1\alpha_1S$ Fusionskonstrukt, $136,41 \pm 4,89 \mu\text{M}$ für α_2S/β_1 Heterodimer und $135,37 \pm 21,81 \mu\text{M}$ für $\beta_1\alpha_2S$ Fusionskonstrukt). Ein Vergleich der basalen maximalen Enzymaktivitäten (V_{\max} Werte) ergab keine signifikanten Unterschiede der NOsGC Fusionskonstrukte im Vergleich zu dem jeweiligen koexprimierten Heterodimer. Die V_{\max} Werte unter basalen Bedingungen betrugen $2,36 \pm 0,35 \mu\text{mol cGMP} / \text{min} \cdot \text{mg}$ für das α_1S/β_1 Heterodimer, $2,96 \pm 0,35 \mu\text{mol cGMP} / \text{min} \cdot \text{mg}$ für das $\beta_1\alpha_1S$ Fusionskonstrukt, $1,49 \pm 0,28 \mu\text{mol cGMP} / \text{min} \cdot \text{mg}$ für das α_2S/β_1 Heterodimer und $1,98 \pm 0,51 \mu\text{mol cGMP} / \text{min} \cdot \text{mg}$ für das $\beta_1\alpha_2S$ Fusionskonstrukt.

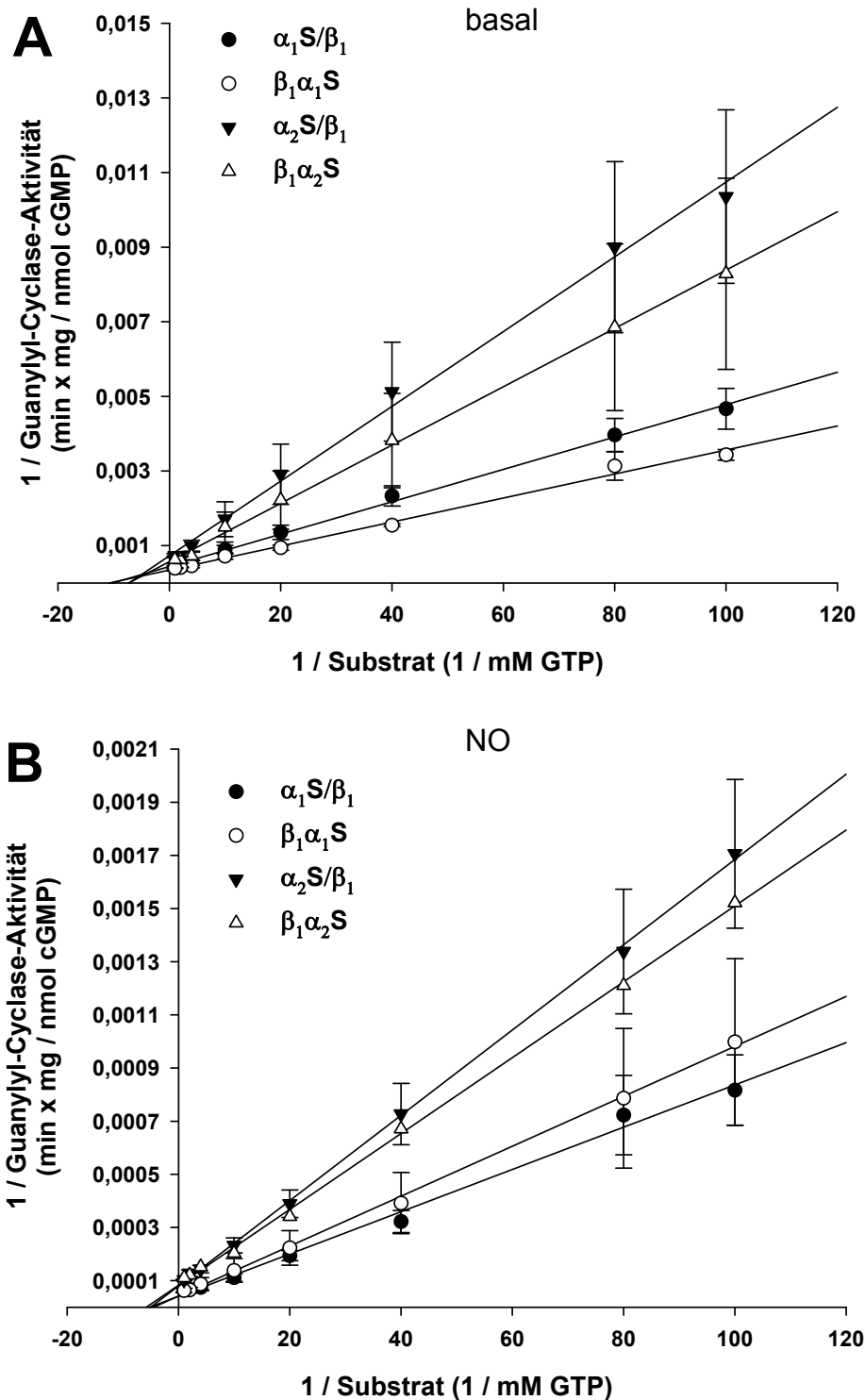


Abbildung 23: Spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter basalen (A) und NO-stimulierten (B) Bedingungen in Abhängigkeit der Substratkonzentration

Zur Ermittlung der K_m und V_{max} Werte wurde die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk gewählt. Die Abbildung zeigt die Substratabhängigkeit für die angereinigten Guanylyl-Cyclase Enzymkomplexe: $\alpha_1\text{S}/\beta_1$ (schwarze Kreise), $\beta_1\alpha_1\text{S}$ (weiße Kreise), $\alpha_2\text{S}/\beta_1$ (schwarze Dreiecke) und $\beta_1\alpha_2\text{S}$ (weiße Dreiecke). Es wurden GTP Konzentrationen zwischen 0,01 und 1 mM eingesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 3$).

Der Lineweaver-Burk-Plot in Anwesenheit von 100 μM DEA/NO ergab K_m Werte von $192,75 \pm 36,50 \mu\text{M}$ für das $\alpha_1\text{S}/\beta_1$ Heterodimer, $213,28 \pm 39,72 \mu\text{M}$ für das $\beta_1\alpha_1\text{S}$ Fusionskonstrukt, $200,80 \pm 35,91 \mu\text{M}$ für das $\alpha_2\text{S}/\beta_1$ Heterodimer und $204,67 \pm 69,68 \mu\text{M}$ für das $\beta_1\alpha_2\text{S}$ Fusionskonstrukt (Abb. 23 B). Es ergaben sich aus dem Diagramm folgende V_{\max} Werte: $24,22 \pm 0,23 \mu\text{mol cGMP} / \text{min} \cdot \text{mg}$ für das $\alpha_1\text{S}/\beta_1$ Heterodimer, $24,73 \pm 3,57 \mu\text{mol cGMP} / \text{min} \cdot \text{mg}$ für das $\beta_1\alpha_1\text{S}$ Fusionskonstrukt, $12,54 \pm 0,86 \mu\text{mol cGMP} / \text{min} \cdot \text{mg}$ für das $\alpha_2\text{S}/\beta_1$ Heterodimer und $14,07 \pm 4,24 \mu\text{mol cGMP} / \text{min} \cdot \text{mg}$ für das $\beta_1\alpha_2\text{S}$ Fusionskonstrukt (Abb. 23 B). Die enzymkinetischen Daten unter NO-stimulierten Bedingungen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den NOsGC Fusionskonstrukten und dem jeweiligen koexprimierten Heterodimer.

4.2.3.5 Konzentrationsabhängiger Einfluss von DEA/NO

Um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der NO-Affinität zwischen den NOsGC Fusionskonstrukten und den koexprimierten Heterodimeren gibt, führten wir eine Stimulation der angereinigten Enzymvarianten mit steigenden DEA/NO Konzentrationen durch.

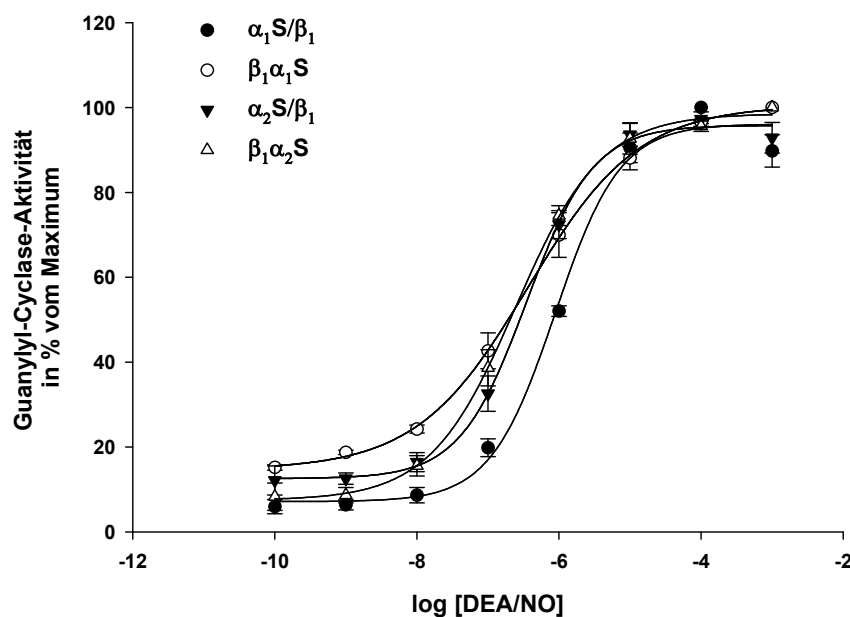


Abbildung 24: Einfluss steigender DEA/NO Konzentrationen auf die Enzymaktivität der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte

Die Kurven zeigen die enzymatischen Aktivitäten von $\alpha_1\text{S}/\beta_1$ (schwarze Kreise), $\beta_1\alpha_1\text{S}$ (weiße Kreise), $\alpha_2\text{S}/\beta_1$ (schwarze Dreiecke) und $\beta_1\alpha_2\text{S}$ (weiße Dreiecke). Es wurden DEA/NO Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 1 mM eingesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 3$).

Ein Vergleich der EC_{50} Werte für DEA/NO zeigte keine signifikanten Unterschiede der NOsGC Fusionskonstrukte im Vergleich zu dem jeweiligen koexprimierten Heterodimer. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, zeigt das koexprimierte α_1S/β_1 Heterodimer eine Tendenz zu einem höheren EC_{50} Wert. Die EC_{50} Werte waren $1,06 \pm 0,10 \mu M$ für das α_1S/β_1 Heterodimer, $0,44 \pm 0,21 \mu M$ für das $\beta_1\alpha_1S$ Fusionskonstrukt, $0,39 \pm 0,11 \mu M$ für das α_2S/β_1 Heterodimer und $0,26 \pm 0,04 \mu M$ für das $\beta_1\alpha_2S$ Fusionskonstrukt.

4.2.3.6 Einfluss von YC-1 auf die NOsGC Fusionskonstrukte

Das nahezu identische Verhalten der NOsGC Fusionskonstrukte im Vergleich zu den koexprimierten Heterodimeren in Bezug auf ihre Substrataffinität und ihre Affinität zu DEA/NO konnte auch in Anwesenheit steigender YC-1 Konzentrationen unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen ermittelt werden. Die EC_{50} Werte für YC-1 für die angereinigten Enzymvarianten in der An- und Abwesenheit von NO sind in Abbildung 25 zu sehen. Das $\beta_1\alpha_2S$ Fusionskonstrukt zeigte im Vergleich zum α_2S/β_1 Heterodimer einen höheren EC_{50} Wert, der aber keine Signifikanz erreichte.

| basal | EC_{50} in μM YC1 | NO | EC_{50} in μM YC1 |
|---------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|
| α_1S/β_1 | $9,25 \pm 2,92$ | α_1S/β_1 | $3,64 \pm 1,68$ |
| $\beta_1\alpha_1S$ | $14,34 \pm 4,62$ | $\beta_1\alpha_1S$ | $3,27 \pm 1,36$ |
| α_2S/β_1 | $27,26 \pm 4,25$ | α_2S/β_1 | $12,71 \pm 0,61$ |
| $\beta_1\alpha_2S$ | $91,27 \pm 12,50$ | $\beta_1\alpha_2S$ | $13,88 \pm 2,08$ |

Abbildung 25: Die EC_{50} Werte für YC-1 der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte

Die EC_{50} Werte wurden unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen für α_1S/β_1 , $\beta_1\alpha_1S$, α_2S/β_1 und $\beta_1\alpha_2S$ bestimmt. Dazu wurde die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter dem Einfluss steigender YC-1 Konzentrationen (von 10 nM bis 200 μM) gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt ($n = 3$).

4.2.3.7 Einfluss von BAY 41-2272 auf die NOsGC Fusionskonstrukte

Im Anschluss führten wir mit BAY 41-2272 ebenfalls eine konzentrationsabhängige Untersuchung der angereinigten Enzymkomplexe in An- und Abwesenheit von NO durch. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den EC_{50} Werten

(Abb. 26) für BAY 41-2272 für die angereinigten Enzymvarianten unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen.

| basal | EC ₅₀ in μM BAY 41-2272 | NO | EC ₅₀ in μM BAY 41-2272 |
|----------------------------|---|----------------------------|---|
| $\alpha_1\text{S}/\beta_1$ | $8,69 \pm 5,51$ | $\alpha_1\text{S}/\beta_1$ | $0,54 \pm 0,15$ |
| $\beta_1\alpha_1\text{S}$ | $15,40 \pm 2,77$ | $\beta_1\alpha_1\text{S}$ | $0,38 \pm 0,09$ |
| $\alpha_2\text{S}/\beta_1$ | $16,65 \pm 4,67$ | $\alpha_2\text{S}/\beta_1$ | $2,50 \pm 0,81$ |
| $\beta_1\alpha_2\text{S}$ | $11,42 \pm 3,49$ | $\beta_1\alpha_2\text{S}$ | $2,24 \pm 0,80$ |

Abbildung 26: Die EC₅₀ Werte für BAY 41-2272 der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte

Die EC₅₀ Werte wurden unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen für $\alpha_1\text{S}/\beta_1$, $\beta_1\alpha_1\text{S}$, $\alpha_2\text{S}/\beta_1$ und $\beta_1\alpha_2\text{S}$ bestimmt. Dazu wurde die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter dem Einfluss steigender BAY 41-2272 Konzentrationen (von 1 nM bis 100 μM) gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt (n = 3).

4.2.3.8 Einfluss von Cinaciguat und Ataciguat

Der Einfluss der NO- und hämunabhängigen Aktivatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Cinaciguat (Abb. 27) und Ataciguat (Abb. 28) auf die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde für die angereinigten NOsGC Fusionskonstrukte und koexprimierten Heterodimere bestimmt. In Gegenwart von 10 μM Cinaciguat konnte die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität für das koexprimierte $\alpha_1\text{S}/\beta_1$ Heterodimer und das $\beta_1\alpha_1\text{S}$ Fusionskonstrukt gesteigert werden (Abb. 27). Das $\beta_1\alpha_1\text{S}$ Fusionskonstrukt zeigte eine signifikant höhere Aktivität in Anwesenheit von Cinaciguat im Vergleich zum α_1/β_1 Heterodimer. Die zusätzliche Behandlung mit 10 μM ODQ führte zu einer weiteren Aktivierung und Steigerung der Enzymaktivität durch Cinaciguat für das koexprimierte $\alpha_1\text{S}/\beta_1$ Heterodimer und das $\beta_1\alpha_1\text{S}$ Fusionskonstrukt. Das koexprimierte $\alpha_2\text{S}/\beta_1$ Heterodimer und $\beta_1\alpha_2\text{S}$ Fusionskonstrukt konnte dagegen nur geringfügig durch 10 μM Cinaciguat aktiviert werden. Auch die zusätzliche Gabe von 10 μM ODQ brachte nur eine minimale Aktivierung durch Cinaciguat. Unter basalen Bedingungen war die spezifische Enzymaktivität signifikant höher bei den NOsGC Fusionskonstrukten im Vergleich zu dem jeweiligen Heterodimer.

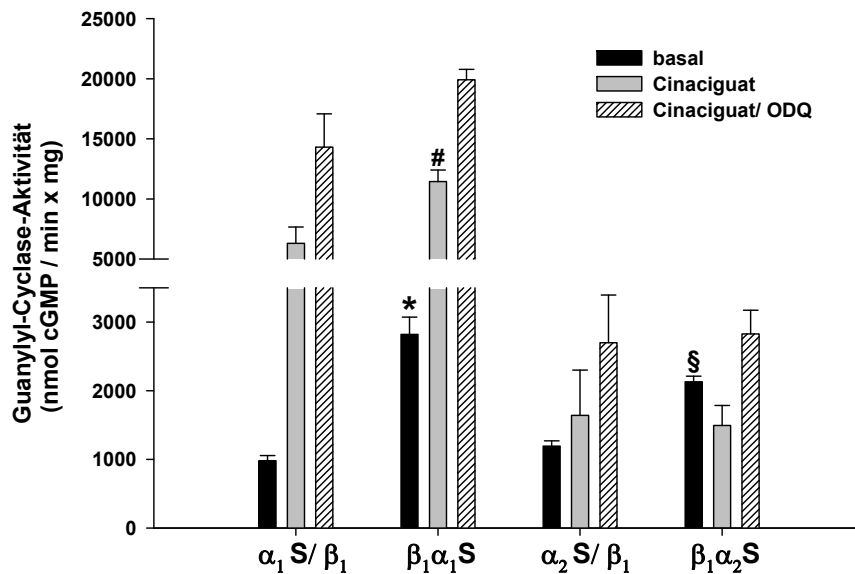


Abbildung 27: Einfluss von Cinaciguat auf die spezifische Enzymaktivität der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte

Die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen), in der Gegenwart von 10 μ M Cinaciguat (graue Säulen) und in der gleichzeitigen Gegenwart von 10 μ M Cinaciguat und 10 μ M ODQ (gestreifte Säulen) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt (n = 3, *p < 0,05 α_1S/β_1 basal vs. $\beta_1\alpha_1S$ basal, #p < 0,05 α_1S/β_1 Cinaciguat vs. $\beta_1\alpha_1S$ Cinaciguat, §p < 0,05 α_2S/β_1 basal vs. $\beta_1\alpha_2S$ basal).

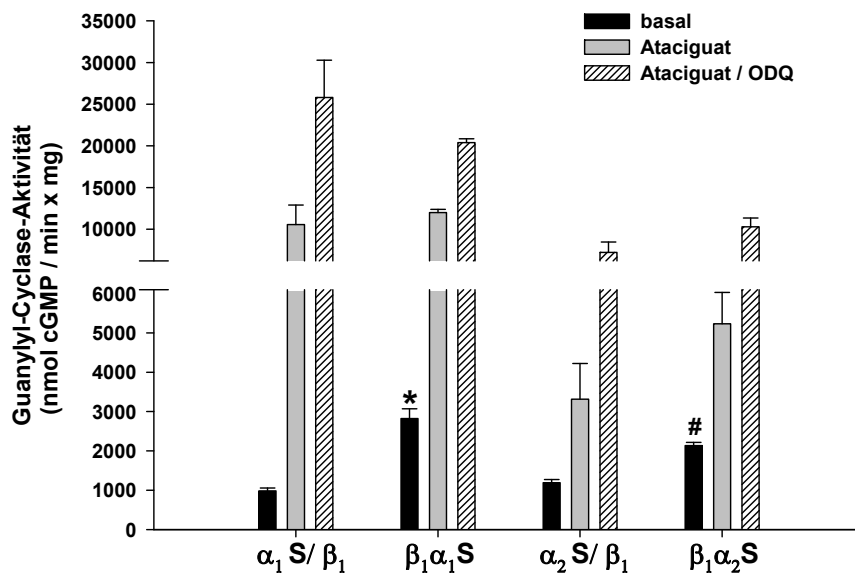


Abbildung 28: Einfluss von Ataciguat auf die spezifische Enzymaktivität der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte

Die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen (schwarze Säulen), in der Gegenwart von 10 μ M Ataciguat (graue Säulen) und in der gleichzeitigen Gegenwart von 10 μ M Ataciguat und 10 μ M ODQ (gestreifte Säulen) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt (n = 3, *p < 0,05 α_1S/β_1 basal vs. $\beta_1\alpha_1S$ basal, #p < 0,05 α_2S/β_1 basal vs. $\beta_1\alpha_2S$ basal).

Abbildung 28 zeigt den Einfluss von Ataciguat auf die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität der angereinigten NOsGC Fusionskonstrukte und koexprimierten Heterodimere. Ebenso wie bei Cinaciguat führte die Anwesenheit von Ataciguat zu einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität, die durch die zusätzliche Anwesenheit von ODQ gesteigert werden konnte. Die Aktivierung durch Ataciguat für die α_2 -enthaltenden Enzymvarianten war ebenfalls signifikant niedriger im Vergleich mit den α_1 -enthaltenden Enzymvarianten (Abb. 32). In Anwesenheit von Ataciguat (10 μ M), alleine oder in Kombination mit ODQ (10 μ M), ergab sich kein Unterschied in der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität zwischen den NOsGC Fusionskonstrukten und den koexprimierten Heterodimeren.

4.2.3.9 Einfluss von Tween 20 und Protoporphyrin IX

Ein weiterer Modulator, der die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase in NO- und hämunabhängiger Weise aktiviert ist Protoporphyrin IX. Protoporphyrin IX ist die natürlich vorkommende eisenfreie Vorstufe des Häms, die den fünffach koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplex imitiert und so zu einer Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase führt [113, 101, 99].

Um zu untersuchen, ob auch Protoporphyrin IX einen Unterschied in der Aktivierung der α_1 - und α_2 -enthaltenden angereinigten Isoformen zeigt, wurde die Bestimmung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Anwesenheit von 100 μ M Protoporphyrin IX, 1 % Tween 20, sowie in gleichzeitiger Anwesenheit von 100 μ M Protoporphyrin IX und 1 % Tween 20 durchgeführt (Abb. 29). Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Inkubation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase mit dem Detergenz Tween 20 zu einem Verlust der Hämgruppe führt [66]. Die NO-Sensitivität ist dadurch aufgehoben und kann durch die Anwesenheit von Protoporphyrin IX zum Teil wieder hergestellt werden. Die Enzymaktivität wurde sowohl unter basalen Bedingungen (Abb. 29 A) als auch in Anwesenheit von 100 μ M DEA/NO (Abb. 29 B) gemessen. Die Zugabe von 1 % Tween 20 verringerte die basale und NO-stimulierte Enzymaktivität bei allen Enzymkomplexen. In Gegenwart von 100 μ M Protoporphyrin IX kam es zu einer Aktivierung der angereinigten Enzymkomplexe unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen. Auch die Aktivierung durch Protoporphyrin IX war für die α_2 -enthaltenden Enzymvarianten signifikant geringer im Vergleich zu den α_1 -enthaltenden Enzymvarianten (Abb. 30). Die Kombination von

Tween 20 und 100 μ M Protoporphyrin IX unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen führte zu einer Zunahme der cGMP-Produktion bei den koexprimierten Heterodimeren und NOsGC Fusionskonstrukten, wobei es zu keinem Unterschied zwischen den α_1 - und α_2 -enthaltenden angereinigten Isoformen kam.

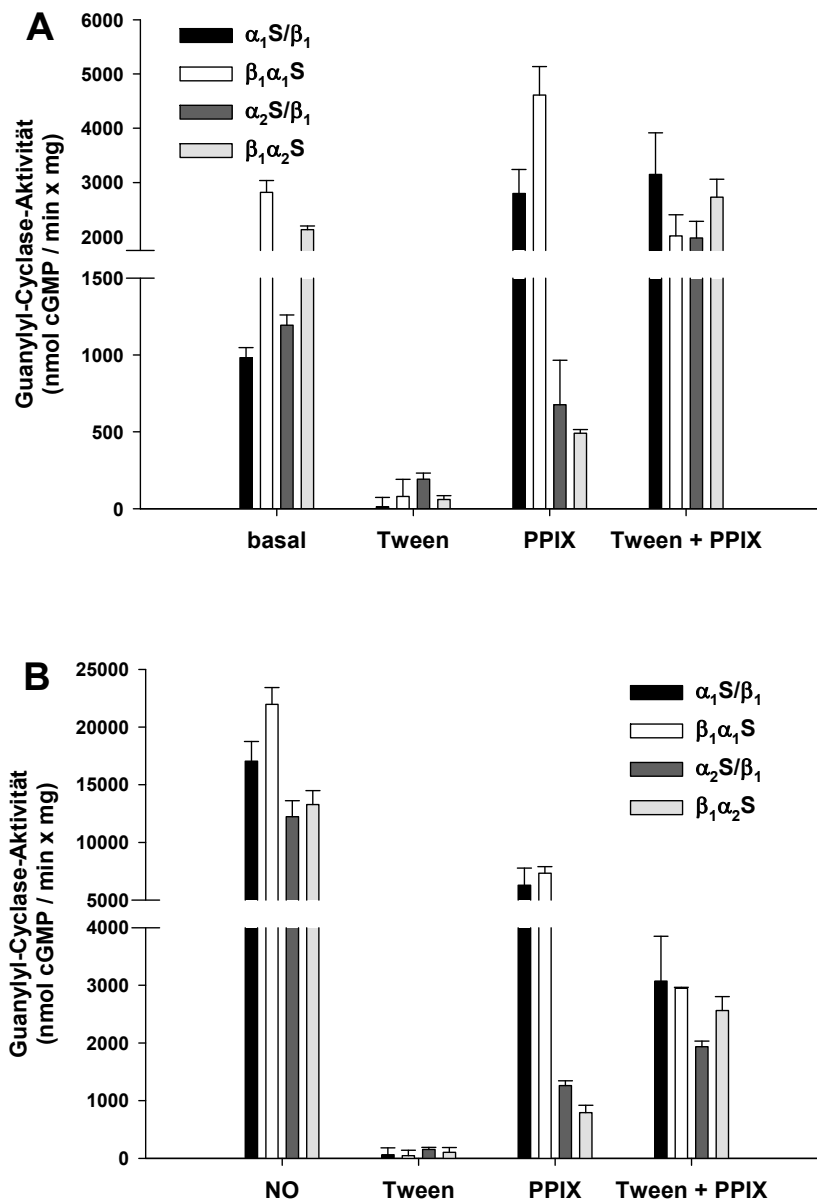


Abbildung 29: Einfluss von Tween 20 und Protoporphyrin IX (PPIX) auf die basale (A) und NO-stimulierte (B) Enzymaktivität

Die angereinigten Enzymkomplexe α_1 S/ β_1 (schwarze Säulen), $\beta_1\alpha_1$ S (weiße Säulen), α_2 S/ β_1 (dunkelgraue Säulen) und $\beta_1\alpha_2$ S (graue Säulen) wurden in Abwesenheit (A) oder in Anwesenheit von 100 μ M DEA/NO (B) auf ihre Enzymaktivität hin untersucht. Tween 20 wurde in einer Konzentration von 1 % (v/v) und PPIX in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm S.E.M.) dargestellt (n = 3).

4.2.4 Zusammenfassung der Daten zu den Untersuchungen an der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im rekombinanten System

4.2.4.1 Charakterisierung der NOsGC Fusionskonstrukte

Die rekombinante Expression der NOsGC Fusionskonstrukte im Baculovirus-Expressionssystem führte zu funktionellen NO-sensitiven Enzymkomplexen. Unsere Daten zeigen, dass sich die NOsGC Fusionskonstrukte in ihren biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften nicht von den koexprimierten Heterodimeren unterscheiden. Daraus lässt sich vermuten, dass die direkte Fusion der Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase die native Konformation und Funktion des Enzymkomplexes unberührt lässt.

4.2.4.2 Vergleich der Daten in Bezug auf die Enzymisoformen

Um einen direkten Vergleich der angereinigten α_1 - und α_2 -enthaltenden Isoformen zu erhalten, wurden die Ergebnisse aller Aktivitätsbestimmungen, in Bezug auf die Isoformenspezifität in Abbildung 30 zusammengestellt. Die Isoformen der koexprimierten Heterodimere (Abb. 30 A) sowie der NOsGC Fusionskonstrukte (Abb. 30 B) wurden dabei getrennt voneinander betrachtet.

| | koexprimierte Heterodimere spezifische Enzymaktivität | | NOsGC Fusionskonstrukte spezifische Enzymaktivität |
|------------------|---|------------------|---|
| | α_1 S/ β_1 im Vergleich zu α_2 S/ β_1 | | $\beta_1\alpha_1$ S im Vergleich zu $\beta_1\alpha_2$ S |
| basal | kein signifikanter Unterschied | basal | kein signifikanter Unterschied |
| NO | kein signifikanter Unterschied | NO | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) |
| YC-1 | kein signifikanter Unterschied | YC-1 | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) |
| NO + YC-1 | kein signifikanter Unterschied | NO + YC-1 | kein signifikanter Unterschied |
| BAY 41-2272 | kein signifikanter Unterschied | BAY 41-2272 | kein signifikanter Unterschied |
| NO + BAY 41-2272 | kein signifikanter Unterschied | NO + BAY 41-2272 | kein signifikanter Unterschied |
| Cinaciguat | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) | Cinaciguat | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) |
| Cinaciguat + ODQ | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) | Cinaciguat + ODQ | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) |
| Ataciguat | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) | Ataciguat | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) |
| Ataciguat + ODQ | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) | Ataciguat + ODQ | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) |
| PPIX | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) | PPIX | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) |
| NO + PPIX | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) | NO + PPIX | signifikant höhere Aktivität ($p < 0,05$) |

Abbildung 30: Vergleich der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivitäten der α_1 und α_2 Isoform der koexprimierten Heterodimere (A) und der NOsGC Fusionskonstrukte (B)

Hierbei ist auffällig, dass der signifikante Unterschied zwischen den Isoformen fast ausschließlich bei der Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase durch einen

der NO- und hämunabhängigen Guanylyl-Cyclase-Modulatoren, Cinaciguat, Ataciguat und Protoporphyrin IX besteht. Die Aktivierung war für die α_2 -enthaltenden Enzymvarianten immer signifikant niedriger im Vergleich mit den α_1 -enthaltenden Enzymvarianten (Abb. 30), unabhängig davon, ob es sich um die koexprimierten Heterodimere oder NOsGC Fusionskonstrukte handelte. Darüber hinaus konnte die α_2 -enthaltende Isoform der NOsGC Fusionskonstrukte durch NO und YC-1 signifikant geringer aktiviert werden, als das α_1 -enthaltende NOsGC Fusionskonstrukt (Abb. 30 B).

5. Diskussion

Endogen freigesetztes NO spielt eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen in unterschiedlichen Organsystemen [183]. Die meisten physiologischen Effekte von NO gehen auf die Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase und damit auf einen intrazellulären Anstieg von cGMP zurück [184].

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase während der postnatalen Entwicklung im Rattenhirn untersucht. Die Ontogenese des Gehirns und Nervensystems beginnt schon im Mutterleib und geht nach der Geburt weiter bis zur Pubertät [178]. Sie ist gekennzeichnet durch Zellproliferation, -migration, -differenzierung und durch die Bildung von Synapsen [178]. Aktuelle, sowie alte Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass der NO / cGMP Signalweg eine wichtige Rolle bei der neuronalen Zelldifferenzierung während der Entwicklung des zentralen Nervensystems spielt: So ist NO bei der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen ein negativer Regulator im Gehirn von Wirbeltieren [185]. In *Drosophila melanogaster* führt eine verminderte Aktivität der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase während der Gehirnentwicklung zu Funktionsstörungen des visuellen Systems und des visuell vermittelten Verhaltens [186]. In den Dendriten ist die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase verantwortlich für orientiertes Wachstum [180]. Das cGMP Signal ist in der Lage Dendriten anzulocken und gleichzeitig Axone abzustößen [187]. NO, das im Neuroepithel gebildet wird, ist darüber hinaus an der Zellzyklus-Progression beteiligt und reguliert die Zellproliferation während der Entwicklung des Neuralrohres [188]. Weil et al. postulierte, dass eine hohe Konzentration von NO verantwortlich ist für Neuralrohrdefekte [188]. Aber auch die Alterung des Gehirns, scheint durch den NO / cGMP Signalweg beeinflusst zu werden [189].

Im Vergleich zu den NO Synthasen ist über die Regulation und Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Gehirn während der Entwicklung wenig bekannt. Jurado et al. zeigten, dass es während der Reifung von cerebralen Körnerzellen *in vitro* zu einem Anstieg der β_1 - und α_2 -Untereinheit auf mRNA Ebene kommt [190]. Die Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Rattenhirn während der postnatalen Entwicklung wurde von Bidmon et al. auf mRNA Ebene und

immunhistochemisch untersucht [191]. Bidmon et al. zeigte, dass es einen Unterschied auf mRNA Ebene zwischen den beiden α -Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase während der postnatalen Entwicklung des Rattenhirns gibt: Während der mRNA Gehalt der α_1 -Untereinheit zurückging, erhöhte sich der mRNA Gehalt der α_2 -Untereinheit im Gehirn von adulten Ratten im Vergleich zu neonatalen [191].

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen zur Expression und Enzymaktivität der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase während der Gehirnentwicklung von Ratten durchgeführt [148]. Dazu wurden Kleinhirn und Großhirn von neonatalen (1-5 Tage alt) und adulten (90-120 Tage alt) Wistar Ratten analysiert. In Übereinstimmung mit den Daten von Bidmon et al. auf mRNA Ebene kam es auf Proteinebene im Kleinhirn zu einer signifikanten Abnahme der Expression der α_1 -Untereinheit. Im Gegensatz dazu nahm die Expression der α_2 -Untereinheit in adulten Tieren im Vergleich zu neonatalen signifikant zu. Die Expression der β_1 -Untereinheit zeigte keinen Unterschied in der Expression während der Entwicklung des Kleinhirns. Die Bestimmung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität zeigte einen signifikanten Anstieg bei adulten Ratten. Dies deutet darauf hin, dass es zu einem Wechsel vom α_1/β_1 Heterodimer zum α_2/β_1 Heterodimer während der postnatalen Entwicklung im Kleinhirn kommt [148]. Im Großhirn kam es ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der Expression der α_2 -Untereinheit in adulten Tieren im Vergleich zu neonatalen. Die Expression der α_1 - und β_1 -Untereinheit zeigte keinen Unterschied. Angesichts dieser Daten war es völlig überraschend, dass die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Großhirn von adulten Ratten im Vergleich zu neonatalen signifikant geringer war [148].

In den Endothelzellen wird NO von der eNOS in den Membranen synthetisiert. NO ist in der Lage aufgrund seiner geringen Größe und Fettlöslichkeit durch die Membranen in benachbarte Zellen zu diffundieren [192]. Im wässrigen Milieu hat NO eine kurze Halbwertszeit, die gerade noch ausreichend ist um als Signalmolekül zu fungieren [193]. Unterschiedliche Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase membranassoziiert vorkommen können [45, 48]. So zeigten Zabel et al., dass durch die Membranassoziation die NO-Sensitivität der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zunimmt [48]. Untersuchungen an dem cGMP-

abhängigen Ionenkanal CFTR („Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“), der bei der Erbkrankheit Mukoviszidose mutiert ist, zeigten einen Effekt abhängig von der Lokalisation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase [194]: Die Aktivierung von CFTR durch cGMP war deutlich effektiver, wenn cGMP durch die membranassoziierte NO-sensitive Guanylyl-Cyclase synthetisiert wurde, als durch die im Cytosol vorkommende [194]. Die Lokalisation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Großhirn von Ratten während der Entwicklung könnte demnach einen Einfluss auf die Stimulierbarkeit des Enzyms durch NO haben.

Um zu untersuchen, ob eine Veränderung der subzellulären Lokalisation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Großhirn von Ratten auftritt, wurde die Expression und spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität in den cytosolischen und membranären Fraktionen bestimmt. In den Membranfraktionen vom Großhirn konnten keine Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen neonatalen und adulten Ratten ermittelt werden. Darüber hinaus konnte eine Stimulierung der Enzymaktivität durch NO in den Membranfraktionen festgestellt werden. Im Cytosol des Großhirns von adulten Ratten kam es zu einer deutlichen Abnahme der NO-stimulierten Enzymaktivität. Die Expression der Untereinheiten war bei den adulten Tieren für die β_1 - und α_1 -Untereinheit gegenüber den neonatalen Tieren nicht signifikant verändert. Die Expression der α_2 -Untereinheit war bei den adulten Tieren sogar signifikant erhöht. Die Diskrepanz zwischen niedriger NO-stimulierter Enzymaktivität bei gleicher oder sogar erhöhter Expression der Untereinheit ließ uns vermuten, dass bisher nicht bekannte Regulationsmechanismen die NO-stimulierte Enzymaktivität im Großhirn von adulten Ratten negativ beeinflusst wird. Interessanterweise verhielt sich die Expression der Untereinheiten zwischen adulten und neonatalen Tieren im Kleinhirn analog zum Großhirn. Hier kam es aber zu keiner Abnahme der Enzymaktivität. Dies zeigt, dass der von uns bisher postulierte unbekannte negative Regulationsmechanismus spezifisch für das Großhirn ist.

Die Stimulation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase durch NO ist abhängig von der prosthetischen Hämgruppe, in der das Hämeisen in reduzierter Form vorliegt [70-71]. Änderungen in der Hämkonzentration während der Entwicklung des Gehirns könnten einen Einfluss auf die vorhandenen Hämoproteine haben. Das Fehlen der prosthetischen Hämgruppe könnte der Grund für den Verlust der spezifischen

Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Großhirn von adulten Tieren sein, auch ohne einen Einfluss auf die Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten. Die Bestimmung der Hämkonzentrationen im Kleinhirn und Großhirn von neonatalen und adulten Ratten ergab eine Abnahme der Hämkonzentration im Großhirn von adulten Ratten. Basierend auf diesem Ergebnis überprüften wir die Hypothese, ob die geringe Hämkonzentration im Großhirn von adulten Tieren einen Einfluss auf die Hämhaltigkeit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase hat. Bis jetzt gibt es noch keine experimentelle Möglichkeit die hämfreie NO-sensitive Guanylyl-Cyclase direkt im Gewebe nachzuweisen. Deshalb bestimmten wir die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Anwesenheit des Hämvorläufers Protoporphyrin IX (PPIX) und den hämunabhängigen NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase-Aktivatoren Atacigat (HMR 1766) und Cinacigat (BAY 58-2667). Cinacigat und Atacigat gehören zu einer neuen Gruppe von Pharmaka für kardiovaskuläre Erkrankungen, bei denen die oxidierte beziehungsweise hämfreie NO-sensitive Guanylyl-Cyclase vermehrt vorkommt [107, 102, 121, 195]. Roy et al. zeigten, dass diese neuen Verbindungen für die Erforschung der Besetzung der Hämtasche des Enzyms in Zellen geeignet sind [120]. Auch in Anwesenheit von Cinacigat und Atacigat kam es zu einer Abnahme der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Großhirn von adulten Tieren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die verminderte Enzymaktivität während des Alterns des Großhirns nicht durch einen Verlust oder eine Oxidation der prosthetischen Hämgruppe verursacht wird.

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase ist nur aktiv als Heterodimer, bestehend aus einer α und einer β_1 -Untereinheit [38-40]. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen der Expression der Untereinheiten und der spezifischen Enzymaktivität wäre ein Reservoir von einzelnen NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten, die keine Heterodimere bilden. Würden die Untereinheiten des oxidierten beziehungsweise hämfreien Enzyms dissoziieren, könnte dies nicht mit Ciguaten nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob eine fehlende Heterodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten der Grund für die Diskrepanz zwischen Enzymaktivität und Expression ist, haben wir Immunpräzipitationsexperimente am Cytosol von Großhirn und Kleinhirn durchgeführt.

Die Immunpräzipitationsanalyse zeigte eine signifikante Verminderung der Heterodimerisierung der α_1 - und β_1 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Großhirn von adulten Tieren. Im Großhirn von adulten Ratten existieren demnach entweder inaktive Homodimere oder ein Reservoir an einzelnen α_1 und β_1 Monomeren, die innerhalb der gleichen Art von Zellen oder in verschiedenen Zellen existieren (Abb. 31). Es ist denkbar, dass es zu Veränderungen der mRNA Transkription oder der Stabilität der α - und β_1 -Untereinheiten in den verschiedenen Regionen des Gehirns während der postnatalen Entwicklung kommt. Dies könnte zu einer unterschiedlichen Verteilung der Untereinheiten in den verschiedenen Zelltypen führen. Allerdings zeigen immunhistochemische Untersuchungen eine Kolo-kalisation der β_1 -Untereinheit mit der α_1 - und α_2 -Untereinheit während der postnatalen Entwicklung des Gehirns ohne einen Hinweis auf einen Überschuss von einzelnen Untereinheiten in spezifischen Zelltypen [191, 196].

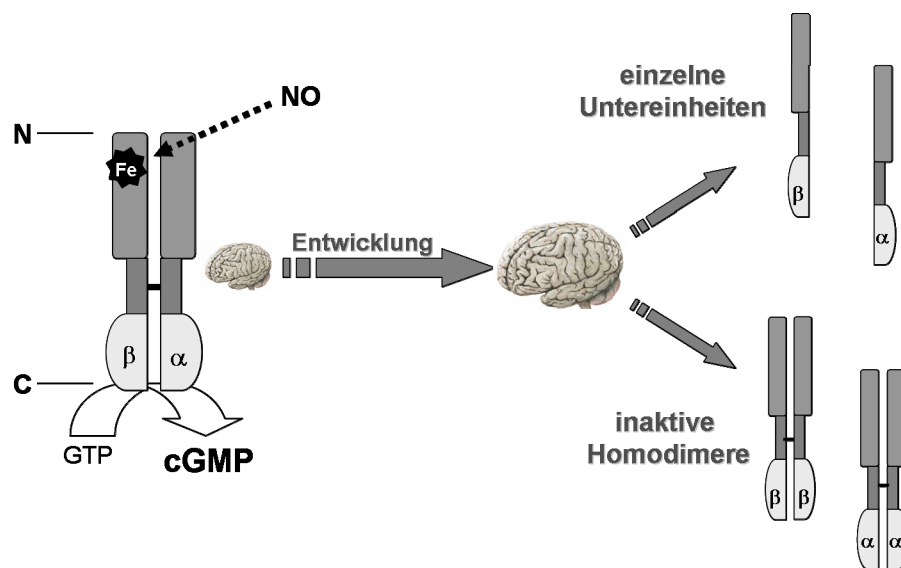


Abbildung 31: Schematische Darstellung der regulierten Heterodimerisierung im Großhirn

Grund für die fehlende Heterodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten und die verminderte Enzymaktivität im Großhirn während der postnatalen Entwicklung des Rattenhirns könnte das Vorhandensein von einzelnen Untereinheiten oder Homodimeren sein.

Eine weitere Möglichkeit für die fehlende Heterodimerisierung der α_1 - und β_1 -Untereinheit im Großhirn von adulten Tieren wäre eine Zunahme der β_2 -Untereinheit. Das könnte zu einer Konkurrenz der beiden β -Untereinheiten um die α_1 -Untereinheit führen und eventuell zur Bildung von inaktiven α_1/β_2 Heterodimeren führen [197-198]. Allerdings konnte die β_2 -Untereinheit nur auf mRNA Ebene in Rattennieren mittels Northern Blot und RNase Protection Assay nachgewiesen werden [199-200]. Im Gehirn von neonatalen und adulten Ratten konnte mit diesen

Methoden keine mRNA für die β_2 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase detektiert werden [191]. Gibb und Garthwaite konnten auch durch *in situ* Hybridisierung im Rattenhirn keine mRNA der β_2 -Untereinheit nachweisen [201], wodurch ein signifikanter Einfluss der β_2 -Untereinheit auf die Heterodimerisierung im Großhirn von adulten Ratten sehr unwahrscheinlich ist.

Aufgrund der niedrigen Hämkonzentration im Großhirn von adulten Tieren (siehe oben), hatten wir als Ursache für die verminderte NO-Stimulierbarkeit des Enzyms im Großhirn von adulten Ratten einen verminderten Hämgehalt der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase vermutet. Dies ließ sich durch Experimente mit den hämunabhängigen Aktivatoren wie Cinaciguat nicht bestätigen. Ein geringer Hämgehalt von isolierten, nicht heterodimerisierenden β_1 -Untereinheiten lässt sich auch mit den hämunabhängigen Aktivatoren nicht ausschließen. Daher wäre es möglich, dass es zu einer mangelnden Assoziation oder einer vermehrten Dissoziation der hämfreien Heterodimere kommt. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung hat Stasch et al. vorgeschlagen, dass die hämfreie NO-sensitive Guanylyl-Cyclase *in vivo* zur Dissoziation neigt (siehe Abb. 7 von Stasch et al. 2006) [195]. Stasch et al. schlagen vor, dass es nach der Dissoziation der Untereinheiten zu einem Abbau der einzeln vorliegenden Untereinheiten kommt [195]. Es wäre aber auch denkbar, dass die Untereinheiten nach der Dissoziation wieder verwendet werden können und die einzelnen vorkommenden Untereinheiten eine Art Reservoir bilden. Eine mangelnde Assoziation oder eine vermehrte Dissoziation der hämfreien NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase könnte durch einen bisher unbekannten zellulären Mechanismus kontrolliert werden und einen neuen Regulationsmechanismus darstellen.

Die Existenz von inaktiven α_1 und β_1 Homodimeren wurde als erstes von Zabel et al. beschrieben [149]. Die Autoren vermuteten, dass eine Regulation der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität *in vivo* durch Veränderungen des Verhältnisses zwischen Heterodimeren und Homodimeren stattfinden könnte. Einen ähnlichen Mechanismus gibt es bei der Heterodimerisierung des hämhaltigen Transkriptionsfaktors BMAL1 (brain and muscle ARNT-like 1), der CO vermittelt durch die Bildung von inaktiven BMAL1 Homodimeren gehemmt wird [202]. CO wird im Organismus von den Hämoxxygenasen unter Verbrauch von Häm gebildet. Die in der Literatur [203]

beschriebene Zunahme der Hämoxxygenase Aktivität und Expression im Gehirn von adulten Ratten im Vergleich zu neonatalen konnten wir bestätigen [204]. Es wäre also denkbar, dass die Produkte der Hämoxxygenasereaktion: CO, Eisen und Biliverdin oder die Abnahme der Hämkonzentration einen Einfluss auf die Heterodimerbildung oder -dissoziation im Großhirn von Ratten während der Entwicklung haben. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Hernandez-Viadel et al. interessant, die zeigen, dass eine chronische Exposition von Ratten mit CO zu einer Beeinträchtigung der Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase führt [205]. Dieser Effekt war stärker ausgeprägt im Cortex als im Kleinhirn von Ratten und wurde nicht begleitet durch eine veränderte Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten [205]. Aufgrund der auffallenden Ähnlichkeit zu unseren Ergebnissen wäre es sinnvoll zu testen, ob eine chronische CO-Exposition zu einer Beeinträchtigung der Heterodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten führt.

Eine fehlende Korrelation zwischen Proteinexpression und Aktivität der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase wurde zuerst von Nedvetsky et al. in einer Studie zur Untersuchung der regionalen Verteilung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Rattenhirn gezeigt [206]. Unsere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Rolle der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Rattenhirn während der postnatalen Entwicklung. Sie zeigen eine auffallend ähnliche mangelnde Korrelation zwischen der Expression und Enzymaktivität. Unsere Daten legen nahe, dass der Grund in einer verminderten Heterodimerisierung der α_1 - und β_1 -Untereinheit im Großhirn von adulten Ratten liegt. Eine Analyse der Heterodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten ist daher eine wichtige Ergänzung zu Expressionsstudien. Wir nehmen darüber hinaus an, dass die Heterodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase ein regulierter Prozess ist, der sich während der postnatalen Entwicklung des Großhirns durch einen bislang noch unbekannten Mechanismus verändert. Aufgrund der verminderten Heterodimerisierung der α_1 und β_1 -Untereinheit ist die α_2/β_1 Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase die vorherrschende Isoform im adulten Großhirn von Ratten. Die Heterodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Kleinhirn während der postnatalen Entwicklung wurde im Gegensatz dazu nicht verändert. Der von uns postulierte

unbekannte Regulationsmechanismus der Heterodimerisierung scheint daher spezifisch für das Großhirn zu sein.

Das Großhirn ist der Sitz des Bewusstseins, des Willens, des Denkens, des Fühlens und des Gedächtnisses. Darüber hinaus sind im Großhirn unter anderem die wesentlichen Funktionen des Sprach- und Hörzentrums, des Lernens, der Bewegungssteuerung und der Verarbeitung visueller Reize zu finden. Das Kleinhirn dagegen verrichtet seine Aufgaben im Unterbewusstsein. Es koordiniert die Motorik und ist an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts beteiligt. Der NO / cGMP Signalweg hat im zentralen Nervensystem einen Einfluss auf die kurz- und langfristige Modulation der synaptischen Effekte [207-209]. Er scheint außerdem eine wichtige Rolle bei der Bildung des Gedächtnisses und des Verhaltens, sowie bei der visuellen und sensorischen Verarbeitung zu spielen [46, 210-212]. Die Wichtigkeit des NO / cGMP Signalweges für eine langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung, die so genannte Langzeit-Potenzierung, im Hippocampus und in der Großhirnrinde ist schon lange bekannt [213-216]. Sie ist entscheidend für Lern- und Gedächtnisprozesse. Es konnte gezeigt werden, dass eine Störung der Langzeit-Potenzierung durch β -Amyloidpeptide im Hippocampus durch Veränderungen im NO / cGMP Signalweg ausgelöst werden kann [217]. Fehlerhaft gefaltete β -Amyloidpeptide bilden im Gehirn von Patienten mit Morbus Alzheimer Plaques, die bereits viele Jahre bevor erste klinische Symptome auftreten sichtbar werden. Sie sind zusammen mit Neurofibrillen, die sich in den Neuronen anlagern, kennzeichnend für diese Erkrankung [218-220]. Die Alzheimer-Krankheit ist die häufigste Ursache von Demenz, die sich durch Schwierigkeiten in der Erinnerung, durch Störungen in der Sprache, durch psychologische und psychiatrische Veränderungen und durch die Beeinträchtigungen in den Aktivitäten des täglichen Lebens manifestiert [221]. Sie betrifft etwa 6% der Bevölkerung, die älter als 65 Jahre sind und deren Häufigkeit mit dem Alter steigt [222]. Die Ursachen für die altersabhängige Veränderung des Aufbaus der β -Amyloidpeptide, sowie von Morbus Alzheimer sind bis jetzt unbekannt. Nach einer Hypothese von Chen et al. und Rowan et al. führt die Ablagerung der β -Amyloidpeptide zu einer beeinträchtigten Langzeit-Potenzierung und somit zum kognitiven Verfall während der Alzheimer-Krankheit [223-224]. Die Langzeit-Potenzierung wird unter anderem durch das von den NO-sensitiven Guanylyl-Cyclasen gebildete cGMP reguliert [225]. Im

Zusammenhang mit Morbus Alzheimer wurden Gewebeproben von Alzheimer Patienten auf ihre spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität untersucht. Bonkale et al. konnten zeigen, dass es im oberen Temporallappen des Großhirns von Patienten mit der Alzheimer-Krankheit zu einer verminderten spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität kommt [226]. Die Studie von Bonkale et al. beruht ausschließlich auf der Messung der Enzymaktivität [226]. Sie gibt keine Auskunft über die Expression der Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase und somit auch nicht über deren Dimerisierung.

Wir konnten hier zum ersten Mal zeigen, dass es während des Alterns zu einer veränderten Heterodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten im Großhirn kommt. Ob es auch zu einer Veränderung der Heterodimerisierung bei der Alzheimer Krankheit kommt und deren Einfluss auf die Langzeit-Potenzierung wäre ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Eine Studie an Tiermodellen konnte zeigen, dass GT 1061 ein therapeutisches NO-Mimetikum neuroprotektive, Kognitions- und Gedächtnis-fördernde Eigenschaften hat [227]. Die Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase und die cGMP-Bildung im Gehirn sollen dabei ein Element der wirksamen neuroprotektiven Strategie sein. Das liefert eine rationale Begründung für den Einsatz von NO-Mimetika in der Behandlung von Morbus Alzheimer [228-230].

Wir konnten zeigen, dass die α_2/β_1 Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase die vorherrschende Isoform im adulten Großhirn ist. Eine Veränderung des Verhältnisses der Isoformen könnte ebenfalls einen Einfluss auf neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer haben: Untersuchungen an Knockout Modellen haben gezeigt, dass beide Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase eine spezifische Rolle bei der Langzeit-Potenzierung in Synapsen im visuellen Cortex haben [231].

Die Knockout Modelle der einzelnen Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase haben die Auswirkungen einer selektiven Unterdrückung einer einzelnen Untereinheit gezeigt [107, 232-233, 231, 234]. Bei den Knockout Mäusen, denen die β_1 -Untereinheit fehlte, kam es zu einem kompletten Verlust der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, was zu einer drastisch reduzierten Lebenserwartung der Mäuse führte [233]. Als wahrscheinlichste Todesursache wurden Motilitätsstörungen des Magen-Darm-Traktes in Betracht gezogen [233]. Im Gegensatz zu den β_1 defizienten

Mäusen, zeigten die Mäuse bei denen die Expression der einzelnen α -Untereinheiten unterdrückt wurde keine offensichtlichen Veränderungen und keine reduzierte Lebenserwartung [235]. Auch führte die Entfernung einer der beiden Untereinheiten nicht zu einem Verlust der β_1 -Untereinheit auf Proteinebene [232]. Außerdem kam es durch den Knockout einer Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase nicht zu einer Hochregulation der verbleibenden Isoform [232, 231, 234]. Da die Knockout Mäuse der α_1 - oder α_2 -Untereinheit eine normale Lebenserwartung zeigten, scheint das gebildete cGMP von der verbleibenden Isoform offenbar ausreichend zu sein, um den Verlust einer Isoform zu kompensieren [235]. Darüber hinaus, sind beide Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in der Lage die gleichen Funktionen in bestimmten Zellen zu übernehmen, wie in Gefäßen wo eine Isoform die Funktionen der anderen ersetzt [232]. Im Gegensatz dazu, haben beide Isoformen im visuellen Cortex eine isoformenspezifische Rolle bei der Langzeit-Potenzierung in Synapsen [231]. Buys et al. konnten mit Hilfe von α_1 Knockout Mäusen zeigen, dass es einen geschlechtsspezifischen Unterschied bei den kardiovaskulären Effekten gibt [234].

Bisher war es nicht möglich, die Auswirkung der selektiven Überexpression einer Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in einem transgenen Mausmodell zu untersuchen. Eine Voraussetzung dafür wäre die Koexpression der α - und β -Untereinheit auf einem ähnlichen Expressionsniveau, was technisch äußerst schwierig ist. Selbst wenn es gelingen sollte, wäre unklar, inwieweit die überexprimierten einzelnen Untereinheiten mit den endogenen Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase interagieren. Aber auch die Bildung von Homodimeren zusätzlich zu den Heterodimeren ist wahrscheinlich. Nach neuesten Untersuchungen zeigen diese eigene Funktionen unabhängig vom cGMP Signalweg: Es gibt Belege dafür, dass die β_1 -Untereinheit ein multifunktionelles Protein ist, das zusätzlich zu seiner Funktion als wichtiger Bestandteil der Heterodimere der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase die Chromatin Kondensation und den Ablauf des Zellzyklus im Zellkern reguliert [150]. Veröffentlichte Daten deuten außerdem darauf hin, dass die α_1 -Untereinheit unabhängig von der β_1 -Untereinheit bei Prostatakrebs einen nicht cGMP-abhängigen Signalweg moduliert [151] und bei dem androgen-unabhängigem Wachstum von Prostatakrebs-Zellen besonders wichtig ist [236]. Für die Entwicklung transgener Mausmodelle für eine selektive Überexpression nur einer

Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, ist die beschriebene Fusion der β_1 -Untereinheit mit einer der α -Untereinheiten damit von großem Vorteil.

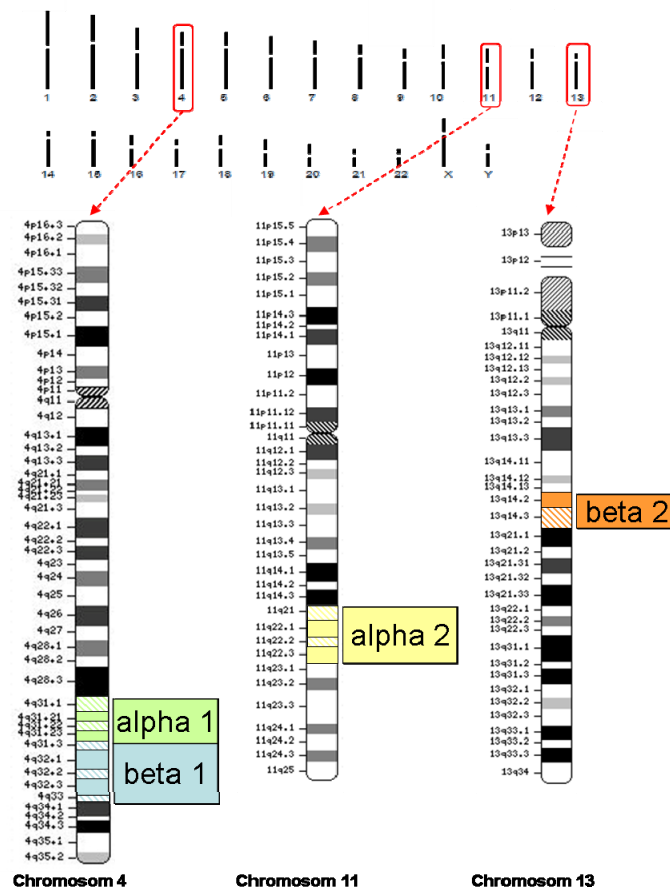


Abbildung 32: Chromosomenlokalisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase beim Menschen

Die Gene der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase liegen auf verschiedenen Chromosomen beim Menschen. Die α_1 -Untereinheit befindet sich auf Chromosom 4 in der Region q31.1-q31.2, direkt kolokalisiert ist die β_1 -Untereinheit in der Region q31.3-q33. Die α_2 -Untereinheit ist auf dem Chromosom 11 in der Region q21-q22 lokalisiert und die β_2 -Untereinheit auf dem Chromosom 13 in der Region q14.2-q14.3.

Betrachtet man die Lokalisation der Gene im Genom verschiedener Arten, zeigt sich eine Kolokalisation der Gene für die α_1 - und β_1 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase [54, 237-238]. Beim Menschen (Abb. 32) befinden sich die Gene für die α_1 - und β_1 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase kolokalisiert auf dem Chromosom 4 in der Region q31-q33 [54]. Im Medaka Fisch haben die α_1 - und β_1 -Untereinheit eine auffallende Tandem-Anordnung, bei der das letzte Exon der α_1 -Untereinheit und das erste Exon der β_1 -Untereinheit weniger als 1000 Basenpaare voneinander getrennt sind [239]. Derzeit ist es unklar, wieso diese eigentümliche genomische Kolokalisation im Laufe der Evolution konserviert blieb. Es gibt keine Spezies bei der bekannt ist, dass sich beide Gene zu einer Polypeptidkette verschmolzen haben, obwohl beide Gene der Untereinheiten sehr nah beieinander

sind. Das Gen für die α_2 -Untereinheit ist nicht mit dem Gen der β_1 -Untereinheit kolokalisiert. Es befindet sich beim Menschen (Abb. 32) auf dem Chromosom 11 in der Region q21-22 [55].

Basierend auf Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer konnten wir zeigen, dass der Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit mit dem Aminoterminal der α -Untereinheiten in räumlicher Nähe ist [182]. Aufgrund dieser Daten haben wir ein $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt und $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstrukt (Abb. 14) generiert. Wir konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass eine direkte Fusion des Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit mit dem Aminoterminal der α -Untereinheiten möglich ist und zu einem funktionellen Enzym führt. Diese NOsGC Fusionskonstrukte unterscheiden sich dabei in ihren biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften nicht wesentlich von den koexprimierten heterodimeren Enzymen. Dabei ist auch die Länge des Linkers zwischen dem Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit und dem Aminoterminal der α -Untereinheiten nicht entscheidend, da beim $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt ein Linker von einer Aminosäure und beim $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstrukt von 53 Aminosäuren entstanden ist.

Die biochemische Charakterisierung der klonierten NOsGC Fusionskonstrukte erfolgte nach Überexpression in Sf9-Zellen. Bisher erforderte die rekombinante Expression einer funktionellen NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase mit dem Baculovirus-Expressionssystem, die Koexpression beider Untereinheiten. Dabei bilden die α_1 und β_1 -Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zusätzlich zu den funktionellen Heterodimeren auch inaktive Homodimere [149]. Die Bildung von α_1 und β_1 Homodimeren in Sf9-Zellen konnten wir bestätigen und darüber hinaus zeigen, dass auch die α_2 -Untereinheit in Sf9-Zellen Homodimere bildet. So wird es bei der rekombinanten Koexpression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase *in vitro* immer eine Mischung von aktiven Heterodimeren und inaktiven Homodimeren geben, die die Untersuchungen des heterodimeren Enzymkomplexes erschweren. Die in dieser Arbeit generierten NOsGC Fusionskonstrukte garantieren eine 1:1 Stöchiometrie zwischen den α - und der β_1 -Untereinheiten. Dies ermöglicht *in vitro* Untersuchungen an reinen NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Heterodimeren, ohne den Einfluss von nicht heterodimerisierenden beziehungsweise homodimerisierenden Untereinheiten.

Die rekombinante Expression der NOsGC Fusionskonstrukte führte zu funktionellen NO-sensitiven Enzymkomplexen, die in den cytosolischen Fraktionen von Sf9-Zellen eine Aktivierbarkeit durch NO und YC-1 zeigten. Für den weiteren Vergleich der NOsGC Fusionskonstrukte mit den koexprimierten Heterodimeren, reinigten wir die verschiedenen Enzymkomplexe an. Als ersten Anreinigungsschritt entschieden wir uns für eine Affinitätschromatographie über einen STRETag II (S) [175] an den α -Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, da die Anreinigung über eine STRETag II -markierte β_1 -Untereinheit zu einem ungleichen Verhältnis der Untereinheiten mit einer Verschiebung zur β_1 -Untereinheit führte. Diese Verschiebung lässt sich durch eine Anreinigung von β_1 Homodimeren erklären. Die Anreinigung über die α -Untereinheiten führte zu einem ähnlichen Verhältnis der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten der koexprimierten Enzymisoformen und war somit für den Vergleich mit den NOsGC Fusionskonstrukten ideal.

Nach der Anreinigung zeigten die NOsGC Fusionskonstrukte in der SDS Gelelektrophorese nur eine Bande bei dem entsprechenden Molekulargewicht, was dafür spricht, dass es sich um ein Fusionsprotein aus einer β_1 - und α -Untereinheit handelt. Die Absorptionsanalyse der angereinigten Enzymvarianten ergab keinen Unterschied zwischen den koexprimierten Heterodimeren und den NOsGC Fusionskonstrukten. In Anwesenheit von DEA/NO kam es bei allen vier Enzymvarianten zur typischen Verschiebung der Soret Bande von 431 nm auf 398 nm. Diese Ergebnisse zeigen, dass die prosthetische Hämgruppe der NOsGC Fusionskonstrukte genauso wie die der koexprimierten Heterodimere mit NO interagiert. Auch der Hämgehalt der angereinigten NOsGC Fusionskonstrukte war übereinstimmend mit dem der angereinigten koexprimierten Heterodimere. Das Verhältnis der Absorption von 430 nm und 280 nm war für alle vier angereinigten Enzymvarianten nicht signifikant unterschiedlich und lag zwischen 0,8 und 0,9. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die NOsGC Fusionskonstrukte untereinander aktive Dimere bilden, indem die α -Untereinheit eines NOsGC Fusionskonstruktes mit der β_1 -Untereinheit eines anderen dimerisiert, führten wir eine analytische Gelfiltration durch. Das Elutionsverhalten der NOsGC Fusionskonstrukte war dabei identisch mit dem entsprechenden koexprimierten Heterodimer. Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, dass die NOsGC Fusionskonstrukte als Monomere vorkommen und auch als Monomer ein funktionelles Enzym darstellen.

Die NOsGC Fusionskonstrukte zeigten auch nach der Anreinigung eine Aktivierbarkeit durch NO und YC-1, wobei sie sich dabei nicht von ihrem entsprechenden koexprimierten Heterodimer unterschieden. Im Gegensatz dazu zeigen die NOsGC Fusionskonstrukte eine signifikant höhere basale Enzymaktivität im Vergleich zum entsprechenden koexprimierten Heterodimer. Darüber hinaus sind die Basalwerte sowohl von den NOsGC Fusionskonstrukten als auch von den koexprimierten Heterodimeren zum Teil mehr als 10-fach höher als in der Literatur beschrieben [66, 72, 240], was sich auf die Stimulation durch NO auswirkt, die dadurch mit maximal 17-fach sehr gering ausfällt. Bei Anreinigungen über die β_1 -Untereinheit zeigten die Enzymkomplexe einen bis zu 10-fach niedrigeren Basalwert als bei der Anreinigung über die α_1 -Untereinheit. Grund dafür ist wahrscheinlich, dass die β_1 Homodimere, die über die STREptag II-markierte β_1 -Untereinheit mit angereinigt wurden, zu einer geringeren basalen Aktivität führen und somit zu einer höheren Stimulierung durch NO. Dies würde auch die unterschiedlichen Aktivierungsfaktoren durch NO zwischen 30- und 200-fach erklären, die in der Literatur beschrieben werden [71, 66, 149, 72, 240]. Diese Differenzen im Aktivierungsfaktor, lassen sich durch nicht-aktive Homodimere erklären: Die Reinheit der funktionellen Heterodimere geht über die Proteinkonzentration in die Berechnung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität ein. In 10 ng angereinigter NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase Fraktion, in der nur funktionelle Heterodimere existieren und keine inaktiven Homodimere vorhanden sind, ist auch die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität höher. Dieser Effekt zeigt sich besonders bei der basalen Enzymaktivität. Möglicherweise ist es darauf zurückzuführen, dass atmosphärisches NO durch hämhaltige β_1 Homodimere weggefangen wird. Dadurch wird die „basale“ Aktivität stärker beeinflusst als die NO-stimulierte, da NO hier im Überschuss vorliegt.

Die Bestimmung der enzymkinetischen Eigenschaften der NOsGC Fusionskonstrukte und der koexprimierten Heterodimere ergab im Wesentlichen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen NOsGC Fusionskonstrukten mit ihren entsprechenden koexprimierten Heterodimeren. So sind die EC_{50} -Werte für DEA/NO, YC-1 und BAY 41-2272 nicht signifikant unterschiedlich. Auch die Untersuchungen der Substratabhängigkeit unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen ergaben keinen signifikanten Unterschied

zwischen den einzelnen NOsGC Fusionskonstrukten und ihren entsprechenden koexprimierten Heterodimeren. Von den NO- und hämunabhängigen Modulatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zeigte sich nur in Anwesenheit von 10 μ M Cinaciguat ein signifikanter Unterschied zwischen dem $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstrukt und dem α_1/β_1 Heterodimer. Für das $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstrukt und α_2/β_1 Heterodimer gab es keinen Unterschied in Anwesenheit von Cinaciguat. Auch in Anwesenheit von Ataciguat und Protoporphyrin IX ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den NOsGC Fusionskonstrukte und den entsprechenden koexprimierten Heterodimeren.

Darüber hinaus konnten wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals zeigen, dass die NO- und hämunabhängigen Aktivatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Cinaciguat und Ataciguat die α_1 Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase effektiver aktiviert als die α_2 Isoform. Auch die Hämvorstufe Protoporphyrin IX aktiviert die α_1 Isoform effektiver als die α_2 Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. Diese Isoformenspezifität von PPIX, Cinaciguat und Ataciguat zeigten sich für die angereinigten koexprimierten Heterodimere und für die NOsGC Fusionskonstrukte. Bisher konnte kein Unterschied in den biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften der beiden Isoformen nachgewiesen werden [41]. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da Cinaciguat und Ataciguat an die H-NOX Domäne der β_1 -Untereinheit bindet, die bei beiden Isoformen gleich ist [107]. Dennoch scheint der intramolekulare Mechanismus, der die Bindung der Ciguat in eine Konformationsänderung der katalytischen Domäne umwandelt, für die beiden Isoformen unterschiedlich zu sein. Cinaciguat und Ataciguat befinden sich derzeit in klinischer Entwicklung. In diesem Zusammenhang gibt die vorliegende Arbeit einen Anstoß genauer zu untersuchen, ob die Isoformenspezifität der Ciguat klinisch etwa zur Vermeidung von unerwünschten Wirkungen nutzbar ist.

Die NOsGC Fusionskonstrukte eröffnen die Möglichkeit die zwei verschiedenen Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase unabhängig voneinander und unabhängig von Monomeren und Homodimeren zu betrachten und so das komplexe Zusammenspiel zwischen den α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheiten zu entschlüsseln. Auch zur Aufklärung der Kristallstruktur des Enzyms könnten die NOsGC Fusionskonstrukte einen Beitrag leisten. Bisher wurden lediglich isolierte Domänen

mit Homologien zu den Domänen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase von Mensch und Ratte kristallisiert [59-60, 241, 74, 242]. Nur die isolierte coiled-coil α -Helix der β_1 -Untereinheit der Ratte konnte als Tetramer kristallisiert werden [243]. Eine Kristallisation der beiden Isoformen in voller Länge ist bislang noch nicht geglückt. Darüber hinaus wäre es mit den NOsGC Fusionskonstrukten möglich, transgene Mausmodelle zu entwickeln, um die selektive Überexpression der beiden Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Organismus zu untersuchen. Über die Grundlagenforschung hinaus wäre es denkbar, die NOsGC Fusionskonstrukte klinisch in der Gentherapie einzusetzen.

6. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase während der postnatalen Entwicklung im Rattenhirn untersucht. Unsere Untersuchungen zeigten, dass im Großhirn eine mangelnde Korrelation zwischen der Proteinexpression und Aktivität der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase existiert. Als Grund für diese fehlende Korrelation konnten wir eine verminderte Heterodimerisierung der α_1 - und β_1 -Untereinheit im Großhirn von adulten Ratten identifizieren. Im Gegensatz dazu wurde die Heterodimerisierung im Kleinhirn während der postnatalen Entwicklung nicht verändert. Wir nehmen daher an, dass die Heterodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase ein regulierter Prozess ist, der sich während der postnatalen Entwicklung des Großhirns durch einen bislang unbekannten Mechanismus verändert. Dieser Regulationsmechanismus scheint spezifisch für das Großhirn zu sein, da er im Kleinhirn nicht auftritt.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit haben wir für *in vitro* Untersuchungen ein Fusionskonstrukt aus den α -Untereinheiten und der β_1 -Untereinheit generiert. Wir konnten damit zum ersten Mal zeigen, dass eine direkte Fusion des Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit mit dem Aminoterminal der α -Untereinheiten möglich ist und zu einem funktionellen Enzym führt. Die NOsGC Fusionskonstrukte unterscheiden sich in ihren biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften nicht wesentlich von den koexprimierten Heterodimeren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass die NO- und hämunabhängigen Aktivatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Cinaciguat und Ataciguat die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase isoformenspezifisch aktiviert. Beide Pharmaka aktivieren die α_1/β_1 Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase effektiver als die α_2/β_1 Isoform.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Murrell W. Nitroglycerin as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1879;1:80-1.
- [2] Rall TW, Sutherland EW. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* 1958;232:1065-76.
- [3] Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 1958;232:1077-91.
- [4] Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1963;11:330-4.
- [5] Goldberg ND, Dietz SB, O'Toole AG. Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine. *J Biol Chem* 1969;244:4458-66.
- [6] Goldberg ND, O'Dea RF, Haddox MK. Cyclic GMP. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1973;3:155-223.
- [7] Hardman JG, Sutherland EW. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 1969;244:6363-70.
- [8] Ishikawa E, Ishikawa S, Davis JW, Sutherland EW. Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J Biol Chem* 1969;244:6371-6.
- [9] Schultz G, Bohme E, Munske K. Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci* 1969;8:1323-32.
- [10] White AA, Aurbach GD. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1969;191:686-97.
- [11] Goridis C, Morgan IG. Guanyl cyclase in rat brain subcellular fractions. *FEBS Lett* 1973;34:71-3.
- [12] Kimura H, Murad F. Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem* 1974;249:6910-6.
- [13] Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, Hardman JG. Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem* 1975;250:374-81.
- [14] Kimura H, Murad F. Subcellular localization of guanylate cyclase. *Life Sci* 1975;17:837-43.
- [15] Kimura H, Murad F. Two forms of guanylate cyclase in mammalian tissues and possible mechanisms for their regulation. *Metabolism* 1975;24:439-45.
- [16] Kaminsky NI, Broadus AE, Hardman JG, Jones DJ, Jr., Ball JH, Sutherland EW, et al. Effects of parathyroid hormone on plasma and urinary adenosine 3',5'-monophosphate in man. *J Clin Invest* 1970;49:2387-95.
- [17] George WJ, Polson JB, O'Toole AG, Goldberg ND. Elevation of guanosine 3',5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970;66:398-403.
- [18] Schultz G, Hardman JG, Schultz K, Baird CE, Sutherland EW. The importance of calcium ions for the regulation of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:3889-93.

-
- [19] Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:3203-7.
- [20] Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 1977;3:23-35.
- [21] Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;75:851-6.
- [22] Schultz K, Schultz G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 1977;265:750-1.
- [23] Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.
- [24] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
- [25] Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983;306:174-6.
- [26] Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983;52:352-7.
- [27] Rapoport RM, Murad F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 1983;9:281-96.
- [28] Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9265-9.
- [29] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
- [30] Deguchi T, Yoshioka M. L-Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1982;257:10147-51.
- [31] Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:87-94.
- [32] Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988;27:8706-11.
- [33] Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 1991;266:22789-91.
- [34] Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep* 1999;19:235-51.
- [35] Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 1999;19:51-71.
- [36] Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 1999;19:133-54.
- [37] Collier J, Vallance P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:427-31.

-
- [38] Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, et al. Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem* 1986;261:7236-41.
- [39] Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G, Bohme E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 1990;272:221-3.
- [40] Buechler WA, Nakane M, Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:351-7.
- [41] Russwurm M, Behrends S, Harteneck C, Koesling D. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* 1998;335 (Pt 1):125-30.
- [42] Bamberger AM, Koglin M, Kempfert J, Loning T, Scholz H, Behrends S. Expression and tissue localization of soluble guanylyl cyclase in the human placenta using novel antibodies directed against the alpha(2) subunit. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:909-12.
- [43] Mergia E, Russwurm M, Zoidl G, Koesling D. Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal* 2003;15:189-95.
- [44] Hoffmüller U, Russwurm M, Kleinjung F, Ashurst J, Oschkinat H, Volkmer-Engert R, et al. Interaction of a PDZ Protein Domain with a Synthetic Library of All Human Protein C Termini. *Angewandte Chemie International Edition* 1999;38:2000-4.
- [45] Russwurm M, Wittau N, Koesling D. Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem* 2001;276:44647-52.
- [46] Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995;57:683-706.
- [47] Brenman JE, Bredt DS. Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol* 1997;7:374-8.
- [48] Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, et al. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol* 2002;4:307-11.
- [49] Agullo L, Garcia-Dorado D, Escalona N, Ruiz-Meana M, Mirabet M, Inserte J, et al. Membrane association of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005;68:65-74.
- [50] Boon EM, Marletta MA. Ligand specificity of H-NOX domains: from sGC to bacterial NO sensors. *J Inorg Biochem* 2005;99:892-902.
- [51] Koglin M, Vehse K, Budaus L, Scholz H, Behrends S. Nitric oxide activates the beta 2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *J Biol Chem* 2001;276:30737-43.
- [52] Morton DB, Anderson EJ. MsGC-beta3 forms active homodimers and inactive heterodimers with NO-sensitive soluble guanylyl cyclase subunits. *J Exp Biol* 2003;206:937-47.
- [53] Behrends S, Vehse K. The beta(2) subunit of soluble guanylyl cyclase contains a human-specific frameshift and is expressed in gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:64-9.
- [54] Giuili G, Roechel N, Scholl U, Mattei MG, Guellaen G. Colocalization of the genes coding for the alpha 3 and beta 3 subunits of soluble guanylyl cyclase to human chromosome 4 at q31.3-q33. *Hum Genet* 1993;91:257-60.
- [55] Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G. Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Lett* 1991;292:217-22.

-
- [56] Behrends S, Kazmierczak B, Steenpa A, Knauf B, Bullerdiek J, Scholz H, et al. Assignment of GUCY1B2, the gene coding for the beta2 subunit of human guanylyl cyclase to chromosomal band 13q14.3 between markers D13S168 and D13S155. *Genomics* 1999;55:126-7.
- [57] Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Friebe A, Schultz G, Koesling D. Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 1995;270:24871-5.
- [58] Iyer LM, Anantharaman V, Aravind L. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics* 2003;4:5.
- [59] Nioche P, Berka V, Vipond J, Minton N, Tsai AL, Raman CS. Femtomolar sensitivity of a NO sensor from *Clostridium botulinum*. *Science* 2004;306:1550-3.
- [60] Pellicena P, Karow DS, Boon EM, Marletta MA, Kuriyan J. Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:12854-9.
- [61] Karow DS, Pan D, Davis JH, Behrends S, Mathies RA, Marletta MA. Characterization of functional heme domains from soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 2005;44:16266-74.
- [62] Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Bohme E, et al. Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2592-6.
- [63] Zhao Y, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA. Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* 1998;37:4502-9.
- [64] Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, Schultz G. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett* 1981;132:71-4.
- [65] Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994;33:5636-40.
- [66] Foerster J, Harteneck C, Malkewitz J, Schultz G, Koesling D. A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur J Biochem* 1996;240:380-6.
- [67] Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP, Marletta MA. A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14753-8.
- [68] Ballou DP, Zhao Y, Brandish PE, Marletta MA. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12097-101.
- [69] Bellamy TC, Wood J, Garthwaite J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:507-10.
- [70] Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch KD, et al. Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* 1990;190:273-8.
- [71] Stone JR, Marletta MA. Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 1995;34:14668-74.
- [72] Koglin M, Behrends S. A functional domain of the alpha1 subunit of soluble guanylyl cyclase is necessary for activation of the enzyme by nitric oxide and YC-1 but is not involved in heme binding. *J Biol Chem* 2003;278:12590-7.

-
- [73] Koglin M, Stasch JP, Behrends S. BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:1057-62.
- [74] Ma X, Sayed N, Baskaran P, Beuve A, van den Akker F. PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure. *J Biol Chem* 2008;283:1167-78.
- [75] Moglich A, Ayers RA, Moffat K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* 2009;17:1282-94.
- [76] Shiga T, Suzuki N. Amphipathic alpha-helix mediates the heterodimerization of soluble guanylyl cyclase. *Zoolog Sci* 2005;22:735-42.
- [77] Rothkegel C, Schmidt PM, Atkins DJ, Hoffmann LS, Schmidt HH, Schroder H, et al. Dimerization region of soluble guanylate cyclase characterized by bimolecular fluorescence complementation in vivo. *Mol Pharmacol* 2007;72:1181-90.
- [78] Liu Y, Ruoho AE, Rao VD, Hurley JH. Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13414-9.
- [79] Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999;43:521-31.
- [80] Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992;176:599-604.
- [81] Kone BC. Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiol Scand* 2000;168:27-31.
- [82] Hecker M, Cattaruzza M, Wagner AH. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 1999;32:9-16.
- [83] Brune B, Mohr S, Messmer UK. Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1996;127:1-30.
- [84] Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 2000;28:N37-52.
- [85] Cary SP, Marletta MA. The case of CO signaling: why the jury is still out. *J Clin Invest* 2001;107:1071-3.
- [86] Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54.
- [87] McCoubrey WK, Jr., Maines MD. The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene* 1994;139:155-61.
- [88] Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 1993;259:381-4.
- [89] Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 1995;48:184-8.
- [90] Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 1996;50:1-5.

-
- [91] Olesen SP, Drejer J, Axelsson O, Moldt P, Bang L, Nielsen-Kudsk JE, et al. Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 1998;123:299-309.
- [92] Zhao Y, Brandish PE, DiValentin M, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* 2000;39:10848-54.
- [93] Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 1994;84:4226-33.
- [94] Friebe A, Schultz G, Koesling D. Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J* 1996;15:6863-8.
- [95] Honicka M, Gerzer R. [Soluble guanyl cyclases. Key enzymes for therapeutic applications of the NO principle]. *Internist (Berl)* 1997;38:427-37.
- [96] Mulsch A, Bauersachs J, Schafer A, Stasch JP, Kast R, Busse R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol* 1997;120:681-9.
- [97] Stone JR, Marletta MA. The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. *Biochemistry* 1995;34:16397-403.
- [98] Denninger JW, Schelvis JP, Brandish PE, Zhao Y, Babcock GT, Marletta MA. Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies. *Biochemistry* 2000;39:4191-8.
- [99] Friebe A, Koesling D. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 1998;53:123-7.
- [100] Russwurm M, Mergia E, Mullershausen F, Koesling D. Inhibition of deactivation of NO-sensitive guanylyl cyclase accounts for the sensitizing effect of YC-1. *J Biol Chem* 2002;277:24883-8.
- [101] Friebe A, Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Schultz G, Koesling D. Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase. *Biochemistry* 1997;36:1194-8.
- [102] Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:755-68.
- [103] Friebe A, Russwurm M, Mergia E, Koesling D. A point-mutated guanylyl cyclase with features of the YC-1-stimulated enzyme: implications for the YC-1 binding site? *Biochemistry* 1999;38:15253-7.
- [104] Lamothe M, Chang FJ, Balashova N, Shirokov R, Beuve A. Functional characterization of nitric oxide and YC-1 activation of soluble guanylyl cyclase: structural implication for the YC-1 binding site? *Biochemistry* 2004;43:3039-48.
- [105] Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001;410:212-5.
- [106] Straub A, Stasch JP, Alonso-Alija C, Benet-Buchholz J, Ducke B, Feurer A, et al. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:781-4.
- [107] Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Haerter M, et al. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* 2002;136:773-83.

-
- [108] Schmidt P, Schramm M, Schroder H, Stasch JP. Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase. *Eur J Pharmacol* 2003;468:167-74.
- [109] Stone JR, Marletta MA. Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide. *Chem Biol* 1998;5:255-61.
- [110] Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, et al. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol* 2001;1:13.
- [111] Hering KW, Artz JD, Pearson WH, Marletta MA. The design and synthesis of YC-1 analogues as probes for soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:618-21.
- [112] Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:2870-3.
- [113] Ignarro LJ, Ballot B, Wood KS. Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. *J Biol Chem* 1984;259:6201-7.
- [114] Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol* 2009:309-39.
- [115] Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br J Pharmacol* 2002;136:637-40.
- [116] Schmidt PM, Schramm M, Schroder H, Wunder F, Stasch JP. Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* 2004;279:3025-32.
- [117] Schmidt PM, Rothkegel C, Wunder F, Schroder H, Stasch JP. Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* 2005;513:67-74.
- [118] Rothkegel C, Schmidt PM, Stoll F, Schroder H, Schmidt HH, Stasch JP. Identification of residues crucially involved in soluble guanylate cyclase activation. *FEBS Lett* 2006;580:4205-13.
- [119] Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, Schaefer S, Schmidt HH, Stasch JP. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol* 2009;157:781-95.
- [120] Roy B, Halvey EJ, Garthwaite J. An enzyme-linked receptor mechanism for nitric oxide-activated guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 2008;283:18841-51.
- [121] Schindler U, Strobel H, Schonafinger K, Linz W, Lohn M, Martorana PA, et al. Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 2006;69:1260-8.
- [122] Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000;52:375-414.
- [123] Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;135:105-49.
- [124] Feil R, Hofmann F. Alternative splicing of cGMP-dependent protein kinase I and nitrate tolerance. *Circ Res* 2003;93:e143.
- [125] Hofmann TG, Jaffray E, Stollberg N, Hay RT, Will H. Regulation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) effector function through dynamic small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification. *J Biol Chem* 2005;280:29224-32.

-
- [126] Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol* 2009;137-62.
- [127] Kleppisch T. Phosphodiesterases in the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 2009;71-92.
- [128] Atkinson RA, Saudek V, Huggins JP, Pelton JT. ¹H NMR and circular dichroism studies of the N-terminal domain of cyclic GMP dependent protein kinase: a leucine/isoleucine zipper. *Biochemistry* 1991;30:9387-95.
- [129] Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 10):1671-6.
- [130] Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 1997;22:307-12.
- [131] Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, et al. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 1998;17:3045-51.
- [132] Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, et al. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* 1999;189:1255-64.
- [133] Ruth P. Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacol Ther* 1999;82:355-72.
- [134] Kaupp UB, Niidome T, Tanabe T, Terada S, Bonigk W, Stuhmer W, et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* 1989;342:762-6.
- [135] Guy HR, Durell SR, Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B. Similarities in amino acid sequences of *Drosophila* eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Science* 1991;254:730.
- [136] Henn DK, Baumann A, Kaupp UB. Probing the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7425-9.
- [137] Hodgkin AL, McNaughton PA, Nunn BJ. The ionic selectivity and calcium dependence of the light-sensitive pathway in toad rods. *J Physiol* 1985;358:447-68.
- [138] Haynes L, Yau KW. Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones. *Nature* 1985;317:61-4.
- [139] Nakamura T, Gold GH. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 1987;325:442-4.
- [140] Ahmad I, Leinders-Zufall T, Kocsis JD, Shepherd GM, Zufall F, Barnstable CJ. Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron* 1994;12:155-65.
- [141] Zufall F, Shepherd GM, Barnstable CJ. Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 1997;7:404-12.
- [142] Biel M, Zong X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, et al. Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3505-9.
- [143] McCoy DE, Guggino SE, Stanton BA. The renal cGMP-gated cation channel: its molecular structure and physiological role. *Kidney Int* 1995;48:1125-33.
- [144] Baylor D. How photons start vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:560-5.

-
- [145] Biel M, Michalakakis S. Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol* 2009;111:36.
- [146] Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, et al. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem* 1999;274:18438-45.
- [147] Juilfs DM, Soderling S, Burns F, Beavo JA. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;135:67-104.
- [148] Hehne N. Signaling complexes of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase during postnatal development. Master Thesis: Lausitz University of Applied Sciences, 2005.
- [149] Zabel U, Hausler C, Weeger M, Schmidt HH. Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem* 1999;274:18149-52.
- [150] Pifarre P, Baltrons MA, Foldi I, Garcia A. NO-sensitive guanylyl cyclase beta1 subunit is peripherally associated to chromosomes during mitosis. Novel role in chromatin condensation and cell cycle progression. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1719-30.
- [151] Cai C, Chen SY, Zheng Z, Omwancha J, Lin MF, Balk SP, et al. Androgen regulation of soluble guanylyl cyclase alpha1 mediates prostate cancer cell proliferation. *Oncogene* 2007;26:1606-15.
- [152] Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 1972;269:192-200.
- [153] Budäus LH. Untersuchung von Untereinheiten der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-Cyclase nach Kopplung mit dem grün-fluoreszierenden Protein. Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Dissertation: Universität Hamburg, 2002.
- [154] Koglin M, Behrends S. Cloning and functional expression of the rat alpha(2) subunit of soluble guanylyl cyclase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1494:286-9.
- [155] Koglin M, Behrends S. Biliverdin IX is an endogenous inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Pharmacol* 2002;64:109-16.
- [156] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [157] Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513-23.
- [158] Morrison GR. Fluorometric Microdetermination of Heme Protein. *Anal Chem* 1965;37:1124-6.
- [159] Kidd IM, Emery VC. The use of baculoviruses as expression vectors. *Appl Biochem Biotechnol* 1993;42:137-59.
- [160] Smith GE, Fraser MJ, Summers MD. Molecular Engineering of the Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Genome: Deletion Mutations Within the Polyhedrin Gene. *J Virol* 1983;46:584-93.
- [161] Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* 1983;3:2156-65.
- [162] Reed L, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoint. *Am J Hyg* 1938:493-7.
- [163] Dougherty RM. Animal virus titration techniques. New York: Academic Press, 1964.
- [164] Hughes PR, Wood HA. In vivo and in vitro bioassay methods of baculoviruses. Boca Raton: CRC Press, 1986.

-
- [165] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [166] Schultz G, Bohme E. Guanylate Cyclase. GTP pyrophosphate-lyase (cyclizing), E.C.4.6.1.2. In: Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. and Grassl, M. (Hrsg.). *Methods of Enzymatic Analysis* 1984;3. Auflage, Band 4, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland:379-89.
- [167] Chan PS, Lin MC. Isolation of cyclic AMP by inorganic salt coprecipitation. *Methods Enzymol* 1974;38:38-41.
- [168] White AA. Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography. *Methods Enzymol* 1974;38:41-6.
- [169] Kimura H, Murad F. Nonenzymatic formation of guanosine 3':5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 1974;249:329-31.
- [170] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- [171] Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* 2002;23:1511-2.
- [172] Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984;10:203-9.
- [173] Schmidt TG, Skerra A. One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* 1994;676:337-45.
- [174] Schmidt TG, Koepke J, Frank R, Skerra A. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* 1996;255:753-66.
- [175] Schmidt TG, Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2007;2:1528-35.
- [176] Voss S, Skerra A. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* 1997;10:975-82.
- [177] Lamla T, Mammeri K, Erdmann VA. The cell-free protein biosynthesis--applications and analysis of the system. *Acta Biochim Pol* 2001;48:453-65.
- [178] Stein J, Schettler T, Wallinga D, Valenti M. In harm's way: toxic threats to child development. *J Dev Behav Pediatr* 2002;23:S13-22.
- [179] Hindley S, Juurlink BH, Gysbers JW, Middlemiss PJ, Herman MA, Rathbone MP. Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. *J Neurosci Res* 1997;47:427-39.
- [180] Polleux F, Morrow T, Ghosh A. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 2000;404:567-73.
- [181] Bicker G. Pharmacological approaches to nitric oxide signalling during neural development of locusts and other model insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 2007;64:43-58.
- [182] Haase T, Haase N, Behrends S. Direct evidence for close proximity of catalytic and regulatory domains of heterodimeric sGC based on fluorescence resonance energy transfer. *BMC Pharmacology* 2009;9:P21.

-
- [183] Martin RJ, Mhanna MJ, Haxhiu MA. The role of endogenous and exogenous nitric oxide on airway function. *Semin Perinatol* 2002;26:432-8.
- [184] Mayer B, Koesling D. cGMP signalling beyond nitric oxide. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:546-8.
- [185] Peunova N, Scheinker V, Cline H, Enikolopov G. Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain. *J Neurosci* 2001;21:8809-18.
- [186] Gibbs SM, Becker A, Hardy RW, Truman JW. Soluble guanylate cyclase is required during development for visual system function in *Drosophila*. *J Neurosci* 2001;21:7705-14.
- [187] Song H, Ming G, He Z, Lehmann M, McKerracher L, Tessier-Lavigne M, et al. Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 1998;281:1515-8.
- [188] Weil M, Abeles R, Nachmany A, Gold V, Michael E. Folic acid rescues nitric oxide-induced neural tube closure defects. *Cell Death Differ* 2004;11:361-3.
- [189] Ibarra C, Nedvetsky PI, Gerlach M, Riederer P, Schmidt HH. Regional and age-dependent expression of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in the human brain. *Brain Res* 2001;907:54-60.
- [190] Jurado S, Sanchez-Prieto J, Torres M. Differential expression of NO-sensitive guanylyl cyclase subunits during the development of rat cerebellar granule cells: regulation via N-methyl-D-aspartate receptors. *J Cell Sci* 2003;116:3165-75.
- [191] Bidmon HJ, Starbatty J, Gorg B, Zilles K, Behrends S. Cerebral expression of the alpha2-subunit of soluble guanylyl cyclase is linked to cerebral maturation and sensory pathway refinement during postnatal development. *Neurochem Int* 2004;45:821-32.
- [192] Chen B, Keshive M, Deen WM. Diffusion and reaction of nitric oxide in suspension cell cultures. *Biophys J* 1998;75:745-54.
- [193] Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR, Jr. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 1998;273:18709-13.
- [194] Bellingham M, Evans TJ. The alpha2beta1 isoform of guanylyl cyclase mediates plasma membrane localized nitric oxide signalling. *Cell Signal* 2007;19:2183-93.
- [195] Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H SA, Meurer S, et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest* 2006;116:2552-61.
- [196] Ding JD, Burette A, Nedvetsky PI, Schmidt HH, Weinberg RJ. Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J Comp Neurol* 2004;472:437-48.
- [197] Gupta G, Azam M, Yang L, Danziger RS. The beta2 subunit inhibits stimulation of the alpha1/beta1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. Potential relevance to regulation of blood pressure. *J Clin Invest* 1997;100:1488-92.
- [198] Gibb BJ, Wykes V, Garthwaite J. Properties of NO-activated guanylyl cyclases expressed in cells. *Br J Pharmacol* 2003;139:1032-40.
- [199] Yuen PS, Potter LR, Garbers DL. A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 1990;29:10872-8.
- [200] Behrends S, Budaeus L, Kempfert J, Scholz H, Starbatty J, Vehse K. The beta 2 subunit of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is developmentally regulated in rat kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;364:573-6.

-
- [201] Gibb BJ, Garthwaite J. Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *Eur J Neurosci* 2001;13:539-44.
- [202] Dioum EM, Rutter J, Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, McKnight SL. NPAS2: a gas-responsive transcription factor. *Science* 2002;298:2385-7.
- [203] Sun Y, Rotenberg MO, Maines MD. Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNAs are detected. *J Biol Chem* 1990;265:8212-7.
- [204] Haase N, Haase T, Seeanner M, Behrends S. Nitric oxide sensitive guanylyl cyclase activity decreases during cerebral postnatal development because of a reduction in heterodimerization. *J Neurochem* 2010;112:542-51.
- [205] Hernandez-Viadel M, Castoldi AF, Coccini T, Manzo L, Erceg S, Felipo V. In vivo exposure to carbon monoxide causes delayed impairment of activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in rat brain cortex and cerebellum. *J Neurochem* 2004;89:1157-65.
- [206] Nedvetsky P, Kleinschnitz C, Schmidt H. Regional distribution of protein and activity of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in rat brain suggests multiple mechanisms of regulation. *Brain Res* 2002;950:148 - 54.
- [207] Haley JE, Schuman EM. Involvement of nitric oxide in synaptic plasticity and learning. *Seminars in Neuroscience* 1994;6:11-20.
- [208] Zhuo M, Hawkins RD. Long-term depression: a learning-related type of synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Rev Neurosci* 1995;6:259-77.
- [209] Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1997;20:298-303.
- [210] Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:213-33.
- [211] Cudeiro J, Rivadulla C. Sight and insight--on the physiological role of nitric oxide in the visual system. *Trends Neurosci* 1999;22:109-16.
- [212] Prickaerts J, Sik A, van Staveren WC, Koopmans G, Steinbusch HW, van der Staay FJ, et al. Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. *Neurochem Int* 2004;45:915-28.
- [213] Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992;32:297-311.
- [214] Wang X, Robinson PJ. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* 1997;68:443-56.
- [215] Son H, Lu YF, Zhuo M, Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. The specific role of cGMP in hippocampal LTP. *Learn Mem* 1998;5:231-45.
- [216] Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* 1999;19:10250-61.
- [217] Puzzo D, Vitolo O, Trinchese F, Jacob JP, Palmeri A, Arancio O. Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 2005;25:6887-97.
- [218] Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006;440:352-7.

-
- [219] Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008;14:837-42.
- [220] Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 2009;457:1128-32.
- [221] Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease. *BMJ* 2009;338:b158.
- [222] Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005;366:2112-7.
- [223] Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y, Xie CW. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *J Neurosci Res* 2000;60:65-72.
- [224] Rowan MJ, Klyubin I, Cullen WK, Anwyl R. Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358:821-8.
- [225] Boulton CL, Southam E, Garthwaite J. Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience* 1995;69:699-703.
- [226] Bonkale WL, Winblad B, Ravid R, Cowburn RF. Reduced nitric oxide responsive soluble guanylyl cyclase activity in the superior temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1995;187:5-8.
- [227] Thatcher GR, Bennett BM, Dringenberg HC, Reynolds JN. Novel nitrates as NO mimetics directed at Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2004;6:S75-84.
- [228] Thatcher GR, Bennett BM, Reynolds JN. Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2005;2:171-82.
- [229] Thatcher GR, Bennett BM, Reynolds JN. NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2006;3:237-45.
- [230] Bennett BM, Reynolds JN, Prusky GT, Douglas RM, Sutherland RJ, Thatcher GR. Cognitive deficits in rats after forebrain cholinergic depletion are reversed by a novel NO mimetic nitrate ester. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:505-13.
- [231] Haghikia A, Mergia E, Friebe A, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T. Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *J Neurosci* 2007;27:818-23.
- [232] Mergia E, Friebe A, Dangel O, Russwurm M, Koesling D. Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest* 2006;116:1731-7.
- [233] Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A, Koesling D. Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7699-704.
- [234] Buys ES, Sips P, Vermeersch P, Raher MJ, Rogge E, Ichinose F, et al. Gender-specific hypertension and responsiveness to nitric oxide in sGCalpha1 knockout mice. *Cardiovasc Res* 2008;79:179-86.
- [235] Mergia E, Koesling D, Friebe A. Genetic mouse models of the NO receptor 'soluble' guanylyl cyclases. *Handb Exp Pharmacol* 2009:33-46.
- [236] Hsieh CL, Cai C, Giwa A, Bivins A, Chen SY, Sabry D, et al. Expression of a hyperactive androgen receptor leads to androgen-independent growth of prostate cancer cells. *J Mol Endocrinol* 2008;41:13-23.

-
- [237] Azam M, Gupta G, Chen W, Wellington S, Warburton D, Danziger RS. Genetic mapping of soluble guanylyl cyclase genes: implications for linkage to blood pressure in the Dahl rat. *Hypertension* 1998;32:149-54.
- [238] Sharina IG, Krumenacker JS, Martin E, Murad F. Genomic organization of alpha1 and beta1 subunits of the mammalian soluble guanylyl cyclase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10878-83.
- [239] Mikami T, Kusakabe T, Suzuki N. Tandem organization of medaka fish soluble guanylyl cyclase alpha1 and beta1 subunit genes. Implications for coordinated transcription of two subunit genes. *J Biol Chem* 1999;274:18567-73.
- [240] Martin E, Berka V, Tsai AL, Murad F. Soluble guanylyl cyclase: the nitric oxide receptor. *Methods Enzymol* 2005;396:478-92.
- [241] Ma X, Sayed N, Beuve A, van den Akker F. NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. *EMBO J* 2007;26:578-88.
- [242] Winger JA, Derbyshire ER, Lamers MH, Marletta MA, Kuriyan J. The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase. *BMC Struct Biol* 2008;8:42.
- [243] Ma X, Beuve A, van den Akker F. Crystal structure of the signaling helix coiled-coil domain of the beta1 subunit of the soluble guanylyl cyclase. *BMC Struct Biol* 2010;10:2.

8. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: NO / cGMP Signalweg | 12 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur und Funktion der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase [50]..... | 14 |
| Abbildung 3: Model des NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Heterodimers | 16 |
| Abbildung 4: Chemische Strukturen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase-Modulatoren | 19 |
| Abbildung 5: Vergleich der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase-Aktivität in Cytosol- und Membranfraktion vom Großhirn neonataler und adulter Ratten | 58 |
| Abbildung 6: Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten im Cytosol vom Großhirn neonataler und adulter Ratten | 59 |
| Abbildung 7: Hämkonzentration im Kleinhirn und Großhirn von neonatalen und adulten Ratten..... | 60 |
| Abbildung 8: Vergleich der hämunabhängigen spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität im Kleinhirn und Großhirn von neonatalen und adulten Ratten..... | 62 |
| Abbildung 9: Western Blot Analyse der β_1 und α_1 Immunpräzipitate aus Cytosolen vom Großhirn neonataler und adulter Ratten..... | 63 |
| Abbildung 10: Densitometrische Analyse der präzipitierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten aus dem Großhirn | 64 |
| Abbildung 11: Densitometrie und Western Blot Analyse der präzipitierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten aus dem Kleinhirn | 65 |
| Abbildung 12: Homodimerisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten | 68 |
| Abbildung 13: Schematische Darstellung der NOsGC Fusionskonstrukte | 69 |
| Abbildung 14: Charakterisierung der Expression des $\beta_1\alpha_1$ Fusionskonstruktes in Sf9-Zellen..... | 70 |
| Abbildung 15: Charakterisierung der Expression des $\beta_1\alpha_2$ Fusionskonstruktes in Sf9-Zellen..... | 70 |
| Abbildung 16: Vergleich der spezifischen Enzymaktivität in cytosolischen Fraktionen von Sf9-Zellen, die die β_1 - und α -Untereinheit koexprimieren oder die NOsGC Fusionskonstrukte exprimieren..... | 71 |
| Abbildung 17: SDS-PAGE Analyse der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte | 72 |
| Abbildung 18: Die Absorptionsspektren der angereinigten Guanylyl-Cyclase Enzymkomplexe | 73 |
| Abbildung 19: Analytische Gelfiltration der angereinigten Guanylyl-Cyclase Enzymkomplexe..... | 75 |
| Abbildung 20: Western Blot Analyse der gepoolten Peakfraktionen der analytischen Gelfiltration | 75 |
| Abbildung 21: Vergleich der spezifischen Enzymaktivität der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte | 76 |
| Abbildung 22: Spezifische Enzymaktivität des koexprimierten α_1/β_1 S Heterodimers angereinigt über die β_1 -Untereinheit..... | 77 |
| Abbildung 23: Spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter basalen (A) und NO-stimulierten (B) Bedingungen in Abhängigkeit der Substratkonzentration | 78 |
| Abbildung 24: Einfluss steigender DEA/NO Konzentrationen auf die Enzymaktivität der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOsGC Fusionskonstrukte..... | 79 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 25: Die EC ₅₀ Werte für YC-1 der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOSGC Fusionskonstrukte | 80 |
| Abbildung 26: Die EC ₅₀ Werte für BAY 41-2272 der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOSGC Fusionskonstrukte | 81 |
| Abbildung 27: Einfluss von Cinaciguat auf die spezifische Enzymaktivität der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOSGC Fusionskonstrukte..... | 82 |
| Abbildung 28: Einfluss von Ataciguat auf die spezifische Enzymaktivität der angereinigten koexprimierten Heterodimere und NOSGC Fusionskonstrukte..... | 82 |
| Abbildung 29: Einfluss von Tween 20 und Protoporphyrin IX (PPIX) auf die basale (A) und NO- stimulierte (B) Enzymaktivität..... | 84 |
| Abbildung 30: Vergleich der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivitäten der α_1 und α_2 Isoform der koexprimierten Heterodimere (A) und der NOSGC Fusionskonstrukte (B)..... | 85 |
| Abbildung 31: Schematische Darstellung der regulierten Heterodimerisierung im Großhirn | 91 |
| Abbildung 32: Chromosomenlokalisierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase beim Menschen | 97 |

9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| ACh | Acetylcholin |
| AS | Aminosäuren |
| Ataciguat | HMR 1766; 5-Chloro-2-[[[(5-chloro-2-thienyl)sulfonyl]amino]-N-[4-(4-morpholinylsulfonyl)phenyl]benzamide |
| BAY 41-2272 | 5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine |
| BK | Bradykinin |
| Bluo-gal | 5-Bromo-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid |
| bp | DNA-Basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| BVES | Baculovirus-Expressionssystem |
| Ca ²⁺ | Calciumionen |
| cAMP | cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CFP (ECFP) | Cyan fluoreszierendes Protein |
| cGK | cGMP-abhängige Proteinkinase |
| cGMP | cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat |
| Ci | Curie |
| Cinaciguat | BAY 58-2667; 4-({CNG-phenyl}=ethyl)amino)methyl)benzoic acid |
| CNG Kanäle | cyclisch Nukleotid-gesteuerten Kanäle |
| CO | Kohlenmonoxid |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| cpm | Zählereignisse pro Minute |
| Da | Dalton |
| DEA/NO | 1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosid-5'-triphosphat |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | verstärkte Chemolumineszenz (enhanced chemiluminescence) |

| | |
|------------------|---|
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EC ₅₀ | halbmaximale Effektorkonzentration |
| EDRF | endothelialer relaxierender Faktor (<i>endothelium derived relaxing factor</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase |
| g | Erdbeschleunigung |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| HABA | 2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure |
| HCl | Chlorwasserstoff (Salzsäure) |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| HO | Hämoxygenase |
| IBMX | 3-Isobutyl-1-methylxanthin |
| IEX | Anionenaustausch (ionexchange) |
| IgG | Immunglobulin |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| IP | Immunpräzipitation |
| IPTG | Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid |
| K _m | Michealis-Menten-Konstante |
| LB | Luria Bertoni |
| MOI | Infektionshäufigkeit (<i>multiplicity of infection</i>) |
| NADPH | Nicotinamadenindinukleotidphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NMDA-Rezeptor | N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor |
| nNOS | neuronale NO-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | NO-Synthase |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OD | optische Dichte |
| ODQ | 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-on |
| ³² P | Phosphor 32 |
| PAS Domäne | benannt nach den ersten drei Proteinen, in denen diese Domäne identifiziert wurde: Per (period circadian protein), Arnt (aryl |

| | |
|--------------------|---|
| | hydrocarbon receptor nuclear translocator protein) und Sim (single-minded protein) |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PDZ-Domäne | benannt nach den ersten drei Proteinen, in denen diese Domäne identifiziert wurde: das synaptische Protein PSD-95, das Septate junction-Protein Discs large und das Tight junction-Protein Zonula occludentes-1 |
| <i>Pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| pI-Wert | isoelektrischer Punkt; definiert als der pH-Wert, bei dem die elektrische Nettoladung Null ist |
| PPIX | Protoporphyrin IX |
| PSD-95 | post-synaptic-density protein von 95 kDa |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| S | STREptag II |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>) |
| S.E.M. | mittlerer Fehler des Mittelwertes (<i>standard error of means</i>) |
| Sf | Spodoptera frugiperda |
| SOC | Salz-optimiertes Medium mit Glukose (Salt-Optimized+Carbon) |
| sGC | lösliche Guanylyl-Cyclase; NO-sensitive Guanylyl-Cyclase |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TAE | Tris-Acetat gepufferte Lösung mit EDTA |
| TBST | Tris-gepufferte Salz-Tween-Lösung (<i>Tris-buffered-saline-tween</i>) |
| TCID ₅₀ | Viruskonzentration, die 50 % der Zellkultur infiziert |
| TEA | Triethanolamin |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethyldiamin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tween20 | Polyoxyethylensorbitanmonolaurat |
| V _{max} | maximale katalytische Rate eines Enzyms |
| YC-1 | 3-[5'-Hydroxymethyl-2'-furyl]-1-benzylindazol |
| YFP (EYFP) | Gelb fluoreszierendes Protein |

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Soenke Behrends für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des Arbeitsthemas am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der Technischen Universität Braunschweig, wobei er mir viele Freiheiten zur eigenen Gestaltung des Forschungsgebietes ließ. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für die außerordentlich produktive und vertrauensvolle Zusammenarbeit, für unzählige motivierende Diskussionen und für seine stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Prof. Dr. Uwe Panten dankbar.

Als nächstes möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für jegliche Unterstützung bedanken und für die freundschaftliche Atmosphäre während des gemeinsamen Arbeitens.

Ganz besonderer Dank geht an meine Familie. Ohne die grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung und Liebe meiner Familie wäre ich nicht da, wo ich jetzt glücklicherweise bin. Sie waren immer für mich da und haben mich stets aufgebaut, wenn es notwendig war.